

Bestimmung der Primärstruktur
der initiierenden methionin-spezifischen
Transfer-Ribonucleinsäure
aus Brauereihefe

Erwin Meixner

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Bestimmung der Primärstruktur der initiiierenden
methionin-spezifischen Transfer-Ribonucleinsäure
aus Brauereihefe

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Erwin Meixner

aus Graz

München 1976



1. Berichterstatter: Prof.Dr.H.Feldmann
2. Berichterstatter: Prof.Dr.G.Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 9.6.1976

Meiner Mutter

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit vom August 1970 bis Juli 1975 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Feldmann danke ich vielmals für die Überlassung des Themas und für die Förderung dieser Arbeit. Den Kollegen der Abteilung danke ich für anregende Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Problemstellung	7
3. Ergebnisse	9
3.1. Trennung und Anreicherung der methionin-spezifischen tRNAs aus Brauereihefe	9
3.1.1. Vorversuche zur Anreicherung der tRNA ^{Met_f}	9
3.1.2. Chromatografie von tRNA an DEAE-Cellulose-Säulen	12
3.1.3. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose-Säulen bei pH 5,0	13
3.1.4. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose-Säulen bei pH 3,0 in Gegenwart von Harnstoff	15
3.1.5. Gelelektrophorese von tRNA	18
3.2. Ermittlung der Sequenz der tRNA ^{Met_f} aus Brauereihefe	22
3.2.1. Spaltung von tRNA und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T ₂	24

	Seite
3.2.2. Spaltung von tRNA und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T ₁	26
3.2.2.1. Analyse der durch Spaltung der tRNA ^{Met_f} mit Ribonuclease T ₁ entstandenen Oligo- nucleotide und Mononucleotide	29
3.2.3. Spaltung von tRNA und Oligonucleotiden mit Ribonuclease A	48
3.2.3.1. Analyse der durch Spaltung der tRNA ^{Met_f} mit Ribonuclease A entstandenen Oligo- nucleotide und Mononucleotide	52
3.2.4. Spaltung der tRNA ^{Met_f} mit Ribonuclease T ₁ unter limitierenden Bedingungen	60
4. Diskussion der Ergebnisse	65
5. Experimenteller Teil	71
5.1. Materialien	71
5.2. Apparative Hilfsmittel	73
5.3. Methoden zur Darstellung der tRNA ^{Met_f}	74
5.3.1. Anzucht von Hefe und Isolierung der tRNA	74
5.3.2. Chromatografie von tRNA an DEAE-Cellulose	75
5.3.3. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose bei pH 5,0	75

	Seite
5.3.1. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose bei pH 3,0 in Gegenwart von 7 M Harn- stoff	76
5.3.5. Gelelektrophorese der tRNA	76
5.3.6. Extraktion der tRNA $^{Met}_f$ aus dem Gel	77
5.4. Spaltung von tRNA $^{Met}_f$ und Oligonucleotiden mit verschiedenen Nucleasen	78
5.4.1. Spaltung von tRNA $^{Met}_f$ und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T ₂	78
5.4.2. Spaltung von tRNA $^{Met}_f$ und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T ₁	78
5.4.3. Spaltung von tRNA $^{Met}_f$ und Oligonucleotiden mit Ribonuclease A	79
5.4.4. Spaltung von Oligonucleotiden mit Ribo- nuclease U ₂	79
5.4.5. Spaltung von Oligonucleotiden mit Phospho- diesterase aus Schlangengift	79
5.4.6. Partieller Abbau von Oligonucleotiden mit Phosphodiesterase aus Schlangengift	80
5.4.7. Spaltung von Oligonucleotiden mit al- kalischer Phosphatase aus E.coli	80
5.4.8. Partieller Abbau von Oligonucleotiden mit Phosphodiesterase aus Kälbermilz	81

	Seite
5.4.9. Modifizierung von Oligonucleotiden mit CMCT und Spaltung mit Ribonuclease A	81
5.4.10. Spaltung der tRNA ^{Met_f} mit Ribonuclease T ₁ unter limitierenden Bedingungen	82
5.5. Trennung von Oligonucleotiden und Mono- nucleotiden	82
5.5.1. Elektrophorese von Oligonucleotiden auf Celluloseacetat-Papier	82
5.5.2. Elektrophorese von Oligonucleotiden auf DEAE-Cellulose-Papier	83
5.5.3. Dünnschicht-Chromatografie von Mono- nucleotiden und Dinucleotiden auf Cellulose-Platten	83
5.5.4. Elektrophorese von Mononucleotiden auf Whatman 3 MM-Papier	84
5.5.5. Homochromatografie von tRNA-Fragmenten	84
5.5.6. Radioaktivitätsmessungen	84
5.5.7. Elution von tRNA und Oligonucleotiden von DEAE-Cellulose-Papier	85
5.5.8. Bestimmung der Akzeptoraktivität der tRNA ^{Met_f}	85
6. Zusammenfassung der Ergebnisse	86

•	Literaturverzeichnis	88
•	Abkürzungsverzeichnis	98

1. Einleitung

Die Transfer-Ribonucleinsäuren (tRNAs) gehören zu den kleinsten biologisch aktiven Nucleinsäuren der Zelle. Sie haben bei mehreren biologischen Prozessen verschiedenartige Aufgaben (1). Als erste Funktion wurde die Rolle der tRNA als Aminosäureakzeptor erkannt (2, 3). Sie fungiert in der Proteinbiosynthese als Adaptor-molekül, das die aktivierte Aminosäure an das 3'-terminale Adenosin bindet und sie zum Ort der Protein-synthese, den Polysomen, transportiert (4). Im Ribosom tritt das Anticodon der tRNA spezifisch mit dem Codon, drei aufeinanderfolgenden Nucleotiden auf der Matrizen-Ribonucleinsäure (mRNA), und mit im Ribosom lokalisierten Faktoren in Wechselwirkung, um so die Proteinbiosynthese zu ermöglichen. Bei der Aminoacylierung der tRNA und bei der Reaktion der Aminoacyl-tRNA mit dem Codon spielt die Aminosäure nur eine passive Rolle. Die Erkennung der spezifischen Aminosäure und damit die Genauigkeit der Proteinbiosynthese (Translation) ist im wesentlichen von der Struktur der tRNA und der zugehörigen Aminoacyl-tRNA-Synthetase abhängig.

Für jede Aminosäure existiert mindestens eine spezifische

Aminoacyl-tRNA-Synthetase und mindestens eine spezifische tRNA; für die meisten Aminosäuren wurden jedoch mehrere isoakzeptierende tRNAs gefunden. In einigen Fällen konnte die Bedeutung dieser Multiplizität geklärt werden. Eine Art der Multiplizität ergibt sich aus der Degeneration des genetischen Codes; für alle Aminosäuren ausser für Tryptophan und Methionin sind mehrere Codons für ein und dieselbe Aminosäure vorhanden (5). Manchmal kann eine spezifische tRNA mit mehreren synonymen Codons, die sich nur in der dritten Base unterscheiden, in Wechselwirkung treten. Aus dieser Erkenntnis entwickelte F. Crick seine " Wobble-Hypothese " (6). Sie besagt in ihrer einfachsten Version, daß nur die ersten beiden Nucleotide in einem Codon für die Spezifität notwendig sind. Aus neueren Erkenntnissen kann man aber schließen, daß in vivo eine spezifischere Selektion der tRNA nötig ist, da z. B. bestimmte seltene Basen in der Wobble-Position des Anticodons die Paarungsmöglichkeiten mit dem Codon einschränken (7).

Die Tatsache, daß einige Organellen (z.B. Mitochondrien, Chloroplasten) eigene spezifische tRNAs besitzen, führt zu einer weiteren Multiplizität der tRNAs (8, 9).

Gut untersucht ist auch die Veränderung des tRNA-Musters nach der Infektion von Bakterien mit Phagen (10).

Nach der Infektion von Säugetierzellen mit Viren konnten

ebenfalls veränderte isoakzeptierende tRNAs gefunden werden (11). Auch Krebszellen haben manchmal im Vergleich zu normalen Zellen aus dem gleichen Gewebe verschiedene isoakzeptierende tRNAs (12, 13). Selbst während der Differenzierung von Zellen kommen verschiedene Mengen und Arten von isoakzeptierenden tRNAs vor (14). Ein gut untersuchtes Beispiel für die Multiplizität sind die Suppressor-tRNAs. Diese tRNAs können durch Veränderung im Anticodon (15), oder an einer anderen Stelle im Molekül (16) durch Mutation veränderte Codons sinnvoll übersetzen.

Sehr genau erforscht ist die Multiplizität der methioninspezifischen tRNAs. In dem Prokaryonten *E. coli* wurden zwei Isoakzeptoren für Methionin gefunden (17). Nur eine dieser tRNAs kann nach der Aminoacylierung mit Methionin durch eine spezifische Transformylase aus demselben Organismus formyliert werden (18). Diese formylierbare tRNA beträgt 70 % der methioninspezifischen tRNAs der Zelle. Der erste Hinweis, daß es auch im Cytoplasma von Eukaryonten verschiedene tRNA-Spezies für Methionin gibt, war die Entdeckung, daß nur ein Teil der methioninspezifischen tRNAs aus Leberzellen von *Cavia porcellus* (Meerschweinchen) mit der Transformylase aus *E. coli* formyliert werden kann (24). Das Cytoplasma der Leberzelle enthält dagegen keine Transformylase-

aktivität (19). In der Brauereihefe *Saccharomyces cerevisiae* C₈₃₆ wurden drei Hauptspezies von methionin-spezifischen tRNAs gefunden, von denen nur eine formylierbar ist (20). Im Gegensatz dazu gibt es in der Bäckerhefe nur zwei Isoakzeptoren für Methionin (21). Auch in Organellen von Eukaryonten (Mitochondrien (21), Chloroplasten (22)) wurden mehrere tRNA-Spezies für Methionin aufgefunden.

Die methionin-spezifischen tRNAs haben folgende Funktionen :

1. Bei Prokaryonten und einigen Organellen von Eukaryonten (9, 22) fungiert eine formylierbare Methionyl-tRNA als Kettenstarter der Proteinbiosynthese (17). Bei Eukaryonten wird die cytoplasmatische Proteinsynthese durch eine spezifische Methionyl-tRNA ohne Formylierung initiiert (23). Diese Methionyl-tRNAs können in vitro mit der Transformylase aus *E. coli* formyliert werden und werden daher als tRNA^{Met_f} bezeichnet (17).
2. Eine oder mehrere methionin-spezifische tRNA(s) haben die Funktion, die Aminosäure Methionin in das Innere einer Proteinkette einzubauen (tRNA^{Met_m}). Diese Methionyl-tRNAs können in vitro nicht enzymatisch formyliert werden (17).

Bei den methionin-spezifischen tRNAs müssen einerseits gleiche Strukturelemente vorhanden sein, da nahezu alle tRNAs für Methionin von der homologen Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* mit Methionin beladen werden (24). Andererseits muß es bei den methionin-spezifischen tRNAs Elemente der Raumstruktur geben, die für die Wechselwirkung der tRNA mit verschiedenen biologischen Molekülen spezifitätsbestimmend sind.

Die beiden tRNA-Spezies werden während der Proteinbiosynthese an verschiedene Orte im Ribosom gebunden. Durch die Reaktion mit Puromycin konnte man die Bindungsstelle der Methionyl-tRNA $^{Met}_f$ festlegen (25). Diese tRNA bindet an den Peptidylort im Ribosom, da bei Zugabe von Puromycin, das an den Aminosäureort im Ribosom bindet, in Gegenwart des Codons A-U-G sofort Methionyl-Puromycin gebildet wird. Unter diesen Bedingungen reagiert die tRNA $^{Met}_m$ nicht mit Puromycin. Diese unterschiedliche Bindung an das Ribosom wird unter anderem durch bestimmte Proteinfaktoren spezifiziert (26).

An der Initiation der Proteinbiosynthese in Prokaryonten sind drei Initiationsfaktoren (IF_1 , IF_2 , IF_3) beteiligt. Die Faktoren IF_1 und IF_2 werden zur Bindung

der fMet-tRNA benötigt (27). Der Faktor IF₃ ist an der Bindung der mRNA an das Ribosom beteiligt (28). Der Faktor IF₂ bindet selektiv nur die fMet-tRNA in Gegenwart des Initiatorcodons A-U-G an das Ribosom. Er reagiert weder mit nichtenzymatisch formylierter, noch mit unformylierter Methionyl-tRNA^{Met_m}, noch mit anderen Aminoacyl-tRNAs (29). In Eukaryonten ist der Mechanismus des Kettenstarts der Proteinsynthese sehr ähnlich (30), obwohl die Initiator-tRNA nicht formyliert wird.

Neben den bisher genannten unterschiedlichen Reaktionen der methionin-spezifischen tRNAs zeigen diese auch eine verschiedene Spezifität in Bezug auf die Codon-Erkennung. In vitro reagieren beide Arten von methionin-spezifischen tRNAs im Ribosomen-Bindungstest (31) mit dem Codon A-U-G; zusätzlich bindet die Met-tRNA^{Met_f} aus E. coli auch an das Codon G-U-G (17, 32). Dieses Codon ist normalerweise ein Triplet für Valin. Experimente an höheren Organismen lieferten ähnliche Ergebnisse. Die Met-tRNA^{Met_f} baut in einem zellfreien System von Maus-Ascites Zellen Methionin in die N-terminale Position des Peptids ein, wenn entweder poly (U-G) oder (A-U-G) oder (G-U-G) als mRNA verwendet werden. Das an tRNA^{Met_m} gebundene Methionin oder Valin wird in dieser Position nicht eingebaut (33). Der molekulare Mechanismus der korrekten Erkennung der mRNA bei der Initiation ist trotz vieler Forschungsergebnisse noch nicht vollständig geklärt.

2. Problemstellung

Die Initiator-tRNAs nehmen aufgrund ihrer speziellen Funktion als Kettenstarter der Proteinbiosynthese eine Sonderstellung unter den tRNAs ein. Zum Verständnis der hochspezifischen Reaktionen dieser tRNAs mit Proteinen und Nucleinsäuren im Verlauf der Proteinbiosynthese muß man die Struktur der Initiator-tRNAs und ihrer Reaktionspartner kennen, um bestimmte Regionen auf diesen Molekülen für die Wechselwirkung zuordnen zu können. In diesem Zusammenhang interessierten uns folgende Fragestellungen:

- (a) Wie unterscheiden sich die Sequenzen der prokaryontischen Initiator-tRNAs von den eukaryontischen ?
- (b) Welche Sequenzhomologien bestehen zwischen den methionin-spezifischen tRNAs ?
- (c) Gibt es Sequenzunterschiede zwischen den Initiator-tRNAs aus verschiedenen Hefestämmen (Brauereihefe und Bäckerhefe), die eine unterschiedliche Anzahl von Isoakzeptoren für Methionin haben ?

Als Beitrag zur Lösung dieser Fragen sollte in dieser Arbeit die Primärstruktur der Initiator-tRNA aus Brauereihefe aufgeklärt werden. Dazu war es zunächst erforderlich, eine geeignete Kombination von chromatografischen Verfahren zur Isolierung der tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe auszuarbeiten. Von dieser tRNA sollte nach der ³²P-Markierungsmethode von Sanger et al. (34) die Sequenz der Nucleotide aufgeklärt werden.

Zur gleichen Zeit haben auch andere Arbeitsgruppen an der Sequenzermittlung von verschiedenen eukaryontischen und prokaryontischen Initiator-tRNAs gearbeitet (35,36). Ihre Ergebnisse werden später im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit an entsprechender Stelle diskutiert werden.

3. Ergebnisse

3.1. Trennung und Anreicherung der methionin-spezifischen tRNAs aus Brauereihefe

3.1.1. Vorversuche zur Anreicherung der tRNA^{Met_f}

Die am häufigsten angewandten Methoden zur Isolierung von tRNAs sind Gegenstromverteilung (38, 39), Säulenchromatografie an DEAE-Cellulose (40), an DEAE-Sephadex (41) und an einigen weiteren Säulenmaterialien, die keine größere Verbreitung gefunden haben (42). In den letzten Jahren haben sich zwei Systeme bei der Chromatografie von tRNAs besonders bewährt; das sogenannte " Reversed Phase " System von Kelmers et al. (43) und die Chromatografie an benzoylierter DEAE-Cellulose (44). Maxwell et al. zeigten, daß das Elutionsverhalten von tRNAs an BD-Cellulose durch aromatische Substitution beeinflußt werden kann. Substituiert man die Aminogruppe einer Aminoacyl-tRNA mit einem Phenoxyacetylrest (45), so wird die derivatisierte tRNA erst mit einem Alkoholgradienten eluiert und kann so von unbeladenen tRNAs abgetrennt werden.

Zur Reindarstellung der tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe wurden in unserem Labor verschiedene säulenchromatografische

Trennmethoden untersucht. Als erstes wurde eine Kombination folgender chromatografischer Methoden getestet:

1. DEAE-Cellulose-Säule
2. BD-Cellulose-Säule pH 5,0
3. DEAE-Sephadex A₅₀-Säule
4. RPC₃-Säule

Die Ausbeute an tRNA^{Met_f} war jedoch nach aufeinanderfolgender Chromatografie der tRNA an diesen Säulen zu gering.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde die oben beschriebene Methode nach Maxwell et al. zur Darstellung der tRNA^{Met_f} geprüft. Da während der Derivatisierung der pH-Wert für 10 Min. auf pH 8,0 eingestellt werden muß, wurde ein Teil der Aminoacylbindung hydrolysiert, was die Ausbeute an tRNA^{Met_f} stark verminderte. Nach der Chromatografie dieser derivatisierten Methionyl-tRNA an BD-Cellulose wurden nur mehr 40 % der eingesetzten Menge an tRNA^{Met_f} (in der Gesamt-tRNA) im Alkoholgradienten eluiert.

Von F. Fittler et al. wurden durch Modifikation verschiedener Chromatografie-Bedingungen zwei neue Methoden zur Trennung von tRNAs an BD-Cellulose entwickelt (46). Durch Kombination einer dieser Trennmethoden (Chromatografie an BD-Cellulose in 7 M Harnstoff bei pH 3,0) mit anderen säulenchromatografischen Methoden war es

möglich, die methionin-spezifischen tRNAs anzureichern.

Die Reihenfolge der chromatografischen Methoden war :

1. DEAE-Cellulose-Säule
2. BD-Cellulose-Säule pH 3,0 in 7 M Harnstoff
3. BD-Cellulose-Säule pH 5,0

Mit verschiedenen Präparationen von BD-Cellulose zeigte die Chromatografie der tRNA an BD-Cellulose bei pH 3,0 vorübergehend eine geringe Reproduzierbarkeit. Durch Änderung der Reihenfolge der chromatografischen Methoden

1. DEAE-Cellulose-Säule
2. BD-Cellulose-Säule pH 5,0
3. BD-Cellulose-Säule pH 3,0 in 7 M Harnstoff

konnte diese Schwierigkeit umgangen werden. Diese Reihenfolge der Säulen hat für die Anreicherung der tRNA^{Met_f} den Vorteil, daß diese tRNA auf Grund des Elutionsprofils der ³²P-Radioaktivität in den Fraktionen der BD-Cellulose-Säule (pH 5,0) eindeutig lokalisiert werden kann, da diese Chromatografie gegenüber verschiedenen Präparationen von BD-Cellulose nicht so störanfällig ist. Auf Grund des größeren Reinheitsgrades der tRNA^{Met_f} konnten auch bei der 3. Chromatografie (BD-Cellulose pH 3,0) mit verschiedenen BD-Cellulose Präparationen stets reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

3.1.2. Chromatografie von tRNA an DEAE-Cellulose-Säulen

DEAE-Cellulose wurde von Bock et al. zum ersten Mal als Säulenmaterial zur Darstellung von tRNAs verwendet (40). Bei der Chromatografie werden die tRNAs von Verunreinigungen mit niedrigem Molekulargewicht, Polysacchariden und Proteinen, die nach der Phenolextraktion noch in der RNA-Lösung vorhanden sind, getrennt.

Zur Reindarstellung der tRNA Met_f aus Brauereihefe wurde die ^{32}P -markierte tRNA ($2,4 \times 10^{10}$ Imp/Min), die nach der Methode von Holley (47) extrahiert worden war, auf eine DEAE-Cellulose Säule aufgetragen und eluiert. Die Messung der Radioaktivität in jeder zweiten Fraktion ergab das in Abb. 1 gezeigte Elutionsprofil.

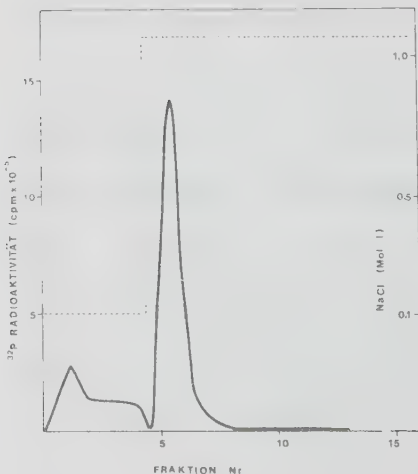


Abb.1 : Chromatografie
von ^{32}P -markierter tRNA
aus Brauereihefe an DEAE
Cellulose bei pH 6,5.
—: ^{32}P -Aktivität
pro 0,05 ml.

3.1.3. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose-Säulen bei pH 5,0

Benzoylierte DEAE-Cellulose hat wegen ihrer hohen Kapazität und Trennschärfe weite Verbreitung zur Darstellung von tRNAs gefunden (44). In einem Vorversuch wurde geprüft, in welcher Position die tRNA $^{Met}_f$ von der Säule eluiert wird. Zu diesem Zweck wurden 300 A_{260} -Einheiten unmarkierter tRNA auf die Säule aufgetragen und eluiert. Die Messung der Extinktion bei 260 nm ergab das in Abb.2 gezeigte Elutionsmuster. Um festzustellen, in welchen Fraktionen die methionin-spezifischen tRNAs enthalten sind, wurde in jeder 5. Fraktion die Akzeptoraktivität für Methionin bestimmt. Es wurden 3 tRNA Met Gipfel gefunden. Die tRNA $^{Met}_f$ ist im 1. Gipfel der Radioaktivität lokalisiert (20). Diese Fraktionen (Nr. 100 - 125) wurden vereinigt und die tRNA mit Äthanol gefällt. Die spezifische Akzeptoraktivität der tRNA betrug in den Spitzenfraktionen 128 pMol Methionin pro A_{260} -Einheit tRNA.

Unter den gleichen Bedingungen wie im Vorversuch wurden die ^{32}P -markierten tRNAs ($1,5 \times 10^{10}$ Imp/Min) aus den vereinigten Fraktionen der DEAE-Cellulose-Säule (vgl. Abb. 1) auf die BD-Cellulose-Säule aufgetragen und eluiert. Die Messung der ^{32}P -Radioaktivität ergab das in Abb. 3 gezeigte Profil. Da das Profil der optischen Dichte bei

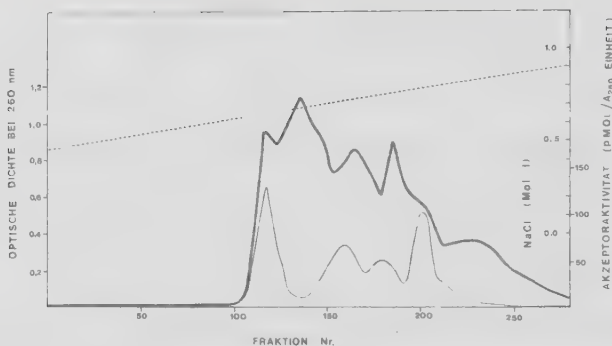


Abb. 2. : Fraktionierung der unmarkierten tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe an einer BD-Cellulose-Säule bei pH 5,0.

— : Extinktion bei 260 nm.

— : tRNA^{Met_f}.

260 nm (vgl. Abb. 2) mit dem Profil der ³²P-Radioaktivität übereinstimmte (vgl. Abb. 3), wurden die Fraktionen, die die tRNA^{Met_f} enthielten (Nr. 96 bis 115), vereinigt und die tRNA mit Äthanol gefällt.

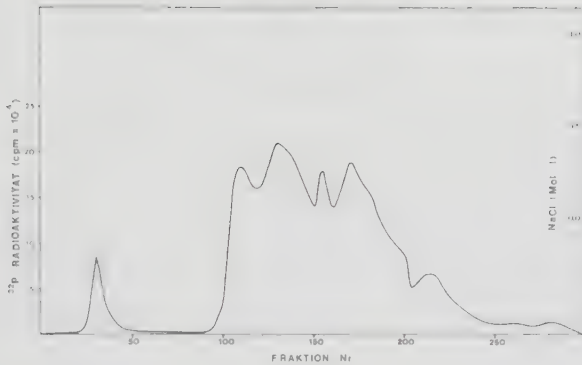


Abb. 3 : Fraktionierung der ^{32}P -markierten $\text{tRNA}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ an einer BD-Cellulose-Säule bei pH 5,0.

_____ : ^{32}P -Radioaktivität / 0,01 ml.

3.1.4. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose-Säulen bei pH 3,0 in Gegenwart von Harnstoff

Die Wechselwirkung zwischen tRNAs und BD-Cellulose werden durch Harnstoff und den sauren pH-Wert so verändert, daß ein anderes Elutionsmuster als bei der BD-Cellulose-Säule unter Standardbedingungen erreicht wird (46). Durch den Harnstoff werden die hydrophoben Wechselwirkungen und die Tertiärstrukturen der tRNAs beeinflusst, ~~ähnliche durch den~~

pH-Wert die Ladung der Adenyl- und Cytidylsäuren verändert wird.

Um zu prüfen, in welchen Fraktionen die tRNA^{Met_f} eluiert wird, wurde die unmarkierte tRNA nach der Chromatografie an BD-Cellulose bei pH 5,0 (vgl. Abb. 2) auf eine BD-Cellulose-Säule pH 3,0 aufgetragen und eluiert.

Die Messung der optischen Dichte bei 260 nm ergab das in Abb. 4 gezeigte Profil.

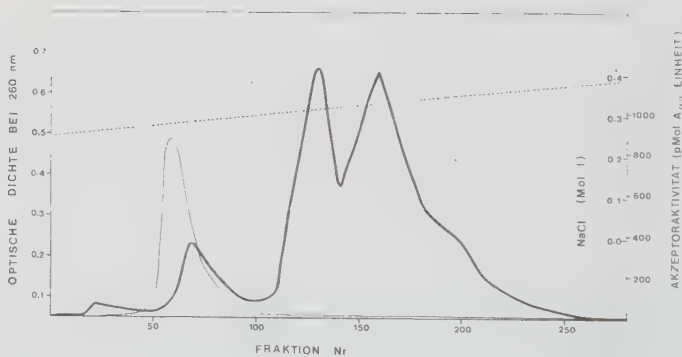


Abb. 4 : Fraktionierung der unmarkierten tRNA^{Met_f} an einer BD-Cellulose-Säule bei pH 3,0.

— : Extinktion bei 260 nm.

— : tRNA^{Met_f}.

- -

Die Bestimmung der Akzeptoraktivität der tRNA in den Fraktionen war nicht direkt möglich, da die tRNA nach der Chromatografie in Harnstoff auf Grund der veränderten Tertiärstruktur teilweise inaktiviert war. Zur Wiederherstellung der Aktivität wurde die tRNA in den Fraktionen gefällt und durch kurzes Erhitzen (2 Min. auf 65°C) reaktiviert (46). Die Bestimmung der Akzeptoraktivität für Methionin ergab das in Abb. 4 gezeigte Profil. In den Spitzenfraktionen hatte die tRNA eine spezifische Akzeptoraktivität von 864 pMol Methionin pro A_{260} -Einheit tRNA. Die Fraktionen 51 - 80 wurden vereinigt und die tRNA gefällt.

Für die Anreicherung der ^{32}P -markierten tRNA Met_f wurde das nach der Chromatografie an BD-Cellulose bei pH 5,0 isolierte Material ($7,3 \times 10^8$ Imp/Min; vgl. Abb. 3) unter identischen Bedingungen chromatografiert. Die Messung der ^{32}P -Radioaktivität ergab das in Abb. 5 gezeigte Elutionsmuster. Die Fraktionen 81 - 110 wurden vereinigt und die tRNA gefällt. Die Ausbeute an ^{32}P -markierter tRNA betrug im Durchschnitt 1×10^7 Imp/Min. Mit einem aliquoten Teil dieses Materials wurde eine Probespaltung mit RNAase T_1 gemacht und die entstandenen Oligonucleotide durch zweidimensionale Elektrophorese getrennt (34). Neben dem Ausmaß der Aminoacylierung kann auch der Fingerprint einer tRNA als Kriterium für den Reinheitsgrad der tRNA herangezogen werden. Da in diesem Falle die

tRNA^{Met_f} noch nicht die erforderliche Reinheit hatte, wurde die tRNA durch präparative Gelelektrophorese weiter gereinigt.

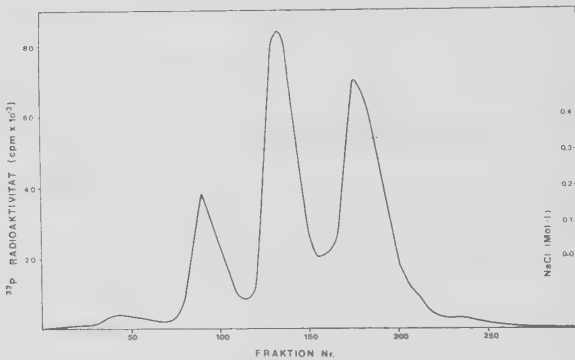


Abb. 5: Fraktionierung von ³²P-markierter tRNA^{Met_f} an einer BD-Cellulose-Säule bei pH 3,0.

_____ : ³²P-Radioaktivität / 0,01 ml.

3.1.5. Gelelektrophorese von tRNA

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit großem Erfolg zur Trennung von verschiedenen Arten von tRNAs verwendet (48). Auch zur Auftrennung von tRNAs hat sich diese Methode in einigen Fällen bewährt (49, 50). In einem Vorversuch wurde das isolierte, unmarkierte

Material nach Chromatografie an BD-Cellulose bei pH 3,0 (vgl. Abb. 4) auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisiert. Die Lokalisation der tRNA erfolgte durch Anfärben mit Toluidinblau (Abb. 6).

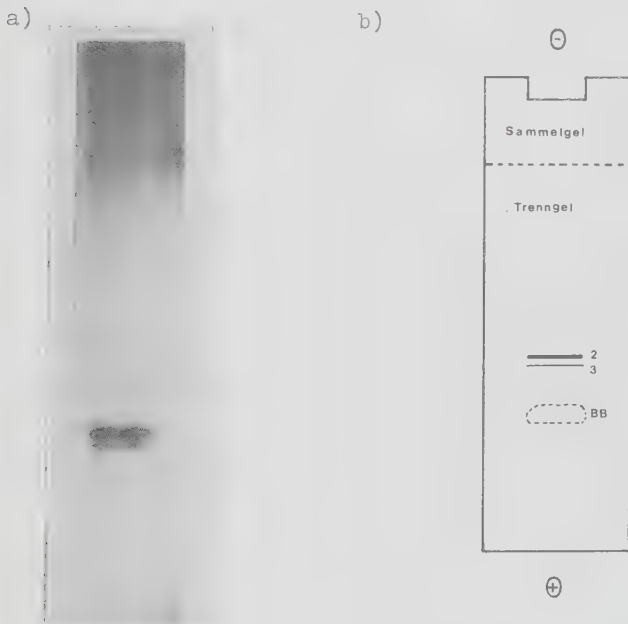


Abb. 6 : Gelelektrophorese der unmarkierten tRNA nach Chromatografie an BD-Cellulose bei pH 3,0 (vgl. Abb.4).

a) Fotografie des Gels.

b) Schematische Darstellung des Bandenmusters.

Die gefärbten Gelzonen wurden ausgeschnitten und die tRNA aus dem Gel eluiert.

Die tRNA der Gelzone Nr. 2 hatte eine Akzeptoraktivität von 1136 pMol Methionin pro A_{260} -Einheit tRNA, während die tRNA der Gelzone Nr. 3 nur eine geringe Akzeptoraktivität für Methionin aufwies. Diese Akzeptoraktivität (60 pMol Methionin pro A_{260} -Einheit tRNA) stammt wahrscheinlich von einer Verunreinigung durch die tRNA aus Gelzone Nr. 2, da es äußerst schwierig war, die beiden Gelzonen exakt getrennt auszuschneiden. Zur Darstellung der ^{32}P -markierten tRNA Met_f wurde die Gelelektrophorese unter identischen Bedingungen durchgeführt (Abb. 7).

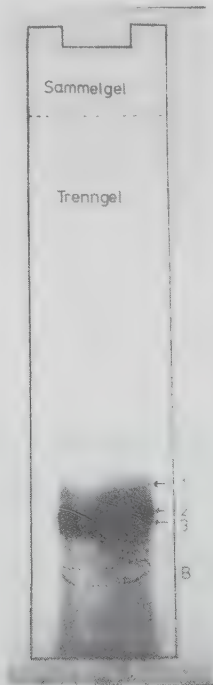


Abb. 7: Autoradiografie
von ^{32}P -markierter tRNA
aus den Fraktionen 81 - 110
der BD-Cellulose Säule
pH 3,0 (vgl. Abb. 5),
nach elektrophoretischer
Auftrennung in einem
10 %-igem Polyacrylamid-Gel.

Die Bande Nr. 1 (vgl. Abb. 7) wurde nach elektrophoretischer Auftrennung der unmarkierten tRNA (vgl. Abb. 6) nicht gefunden, da wahrscheinlich die Menge der tRNA, die dieser Bande entsprach, bei dieser Färbemethode unter der Nachweisgrenze lag. Die tRNA aus der Bande Nr. 2, die den gleichen R_{BB} -Wert hatte, wie die tRNA^{Met_f} aus dem Vorversuch, wurde ausgeschnitten und die tRNA eluiert. Bei der eingesetzten Menge von 300 A₂₆₀-Einheiten tRNA betrug die Ausbeute je nach Aufarbeitung 4 bis 5 A₂₆₀-Einheiten tRNA mit einer durchschnittlichen spezifischen Aktivität von $1,6 \times 10^6$ Imp/Min/A₂₆₀-Einheit tRNA. Mit einem aliquoten Teil der tRNA wurde eine Spaltung mit RNAase T₁ durchgeführt und die Oligonucleotide durch zweidimensionale Elektrophorese getrennt. Die Auswertung des " Fingerprints " zeigte, daß die tRNA den erforderlichen Reinheitsgrad für die Sequenzanalyse hatte.

3.2. Ermittlung der Sequenz der tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe

Es gibt drei häufig angewandte Methoden zur Bestimmung der Sequenz von Nucleinsäuren. Bei der von Holley et al. (51) verwendeten Methode wird unmarkierte tRNA mit spezifischen Enzymen in eine Reihe von kleineren Fragmenten gespalten. Diese können dann zum Beispiel durch Chromatografie an DEAE-Cellulose getrennt werden. Die jeweilige Nucleotidsequenz dieser Fragmente wird durch spezifische Nachspaltungen mit entsprechenden Enzymen ermittelt. Als Vorteil bei der Sequenzermittlung von tRNAs erwies sich das, im Vergleich zu den übrigen RNAs, häufige Vorkommen von modifizierten Nucleotiden, die als " Markierungspunkte " die Ableitung der Sequenz erleichtern.

Sanger et al. (34) verwendeten ³²P-markierte tRNA. Auch bei dieser Methode werden durch Spaltung mit spezifischen Enzymen Fragmente gebildet, die jedoch durch Elektrophorese auf Papier getrennt werden. Der Vorteil dieser Methode ist der geringe Materialbedarf und Arbeitsaufwand, sowie die Schnelligkeit der Analyse. Nachteilig wirkt sich das Auftreten von unbekannten modifizierten Nucleotiden aus, da diese nur aufgrund ihrer elektrophoretischen und chromatografischen Beweglichkeit relativ zu einer Bezugssubstanz identifiziert werden können.

Bei der dritten häufig angewandten Methode wird unmarkierte RNA wie bei der zuerst erwähnten Methode mit spezifischen Enzymen gespalten. Die entstandenen Spaltprodukte werden mit Hilfe des Enzyms Polynucleotid - Kinasen (52) am 5'-Hydroxylende mit ^{32}P markiert und können dann nach der Sangerschen Methode weiter analysiert werden.

Zur Sequenzermittlung von tRNAs haben sich einige spezifische Enzyme besonders bewährt. In dieser Arbeit, die nach der Methode von Sanger et al. (34) ausgeführt wurde, wurden die RNAasen T_1 , T_2 , A, U_2 sowie die Phosphodiesterasen aus Kälbermilz und Schlangengift verwendet. Zur Abspaltung von Phosphatgruppen von Oligonucleotiden wurde die alkalische Phosphatase aus E.coli benutzt. Eine weitere Möglichkeit, andere spezifische Spaltstellen zu erhalten, ist, die tRNA mit CMCT chemisch zu modifizieren. Dieses Reagens reagiert hauptsächlich mit Uridin und Guanotin, so daß diese Nucleoside von der RNAase A nicht erkannt werden. Diese Nuclease spaltet dann spezifisch neben Cytosin-3'-Phosphat.

3.2.1. Spaltung von tRNA und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T₂

RNAase T₂ ist eine unspezifische Nuclease, die die Phosphordiester-Bindung zwischen dem 3'-Phosphat eines Nucleotids und der 5'-Hydroxylgruppe des nächsten Nucleotids spaltet (53). Bei ausreichender Hydrolyse mit RNAase T₂ wird die tRNA quantitativ in 3'-Nucleosidphosphate zerlegt. Einige Phosphordiester-Bindungen nach seltenen Nucleotiden (z.B. 2'-O-Methylguanosin, 2'-O-Methylcytosin) kann das Enzym nicht spalten. Die RNAase T₂ wurde trotz der erwähnten Nachteile bevorzugt zur Totalhydrolyse der tRNA und der Oligonucleotide verwendet, da bei der Totalspaltung der tRNA mit 10 % Piperidinlösung oder mit 0,2 N Natronlauge eine Mischung von 2'- und 3'-Nucleotiden entsteht und viele seltene Basen in andere Basen umgewandelt werden (34).

Zur Ermittlung der Nucleotidzusammensetzung der tRNA^{Met_f} wurde die tRNA mit RNAase T₂ gespalten. Die entstandenen Nucleotide wurden durch zweidimensionale Dünnschicht-Chromatografie nach Nishimura et al. (54) aufgetrennt. Die Autoradiografie ergab das in Abb. 8 gezeigte Bild. Die weitere Charakterisierung der Nucleotide erfolgte durch Elektrophorese im System C (vgl. 5.5.4.). Es wurden die

Nucleotide Ap, Up, Cp und Gp zwölf seltene Nucleotide gefunden. Je zwei Mole m^1Cp und Dp, sowie je ein Mol m^1Gp , m^2Gp , m^2Gp , t^6Ap , m^7Gp , m^1Ap und ein Mol eines Dinucleotids (X-Yp). Die Struktur von X-Yp ist unbekannt, aber es dürfte sich um das gleiche Dinucleotid ($A^{\times}G^{\times}$) handeln, das RajBhandary et al. (35) in Bäckerhefe gefunden haben (s. Ableitung der Sequenz von t_{14}). Die Molzahlen ergaben sich aus der Messung der ^{32}P -Radioaktivität.

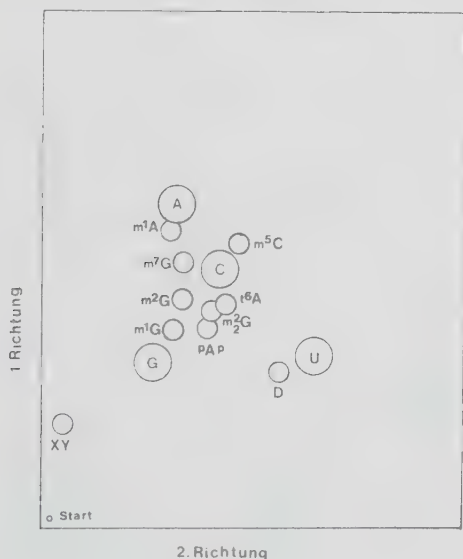


Abb. 8 : Totalspaltung der $tRNA^{Met_f}$ mit RNAase T_2 und Auftrennung der Spaltprodukte durch zweidimensionale Dünnschicht-Chromatografie.

1.2. Spaltung von tRNA und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T₁

Die Ribonuclease T₁ ist eine Endonuclease aus *Aspergillus Oryzae* und spaltet die Phosphordiester-Bindung zwischen dem Guanosin-3'-Phosphat und der Hydroxylgruppe des nächsten Nucleotids. Als Intermediärprodukt entsteht ein cyclisches 2'-3'-Guanosinphosphat. Einige Bindungen kann diese Nuclease allerdings nicht spalten (z.B. 2'-O-Methylguanosinphosphat, 7-Methylguanosinphosphat) (55).

³²P-markierte tRNA^{Ala} wurde mit RNase T₁ gespalten und die entstandenen Oligonucleotide durch zweidimensionale Elektrophorese nach Sanger et al. getrennt (34). Abb. 9 zeigt die Lage der durch Autoradiografie sichtbar gemachten Oligonucleotide.



Abb. 9 : Autoradiografie der zweidimensionalen Auftrennung der durch Spaltung der tRNA ³²P-markierten, entstandenen Oligonucleotide.

Abb. 10 zeigt in einem Diagramm die Positionen, die Numerierung und die Sequenz der Oligonucleotide (vgl. Abb. 9).

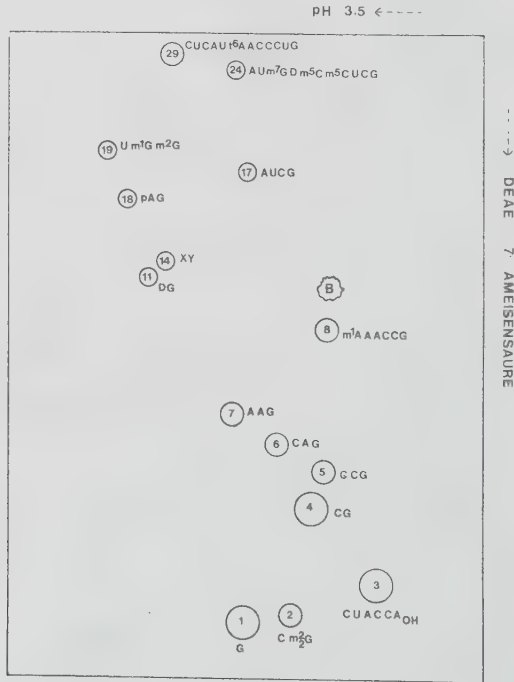


Abb. 10 : Diagramm mit den Positionen, den Identifizierungsnummern und Sequenzen der durch Spaltung der tRNA^{Met}_f mit RNAase T₁ entstandenen Oligonucleotide nach Auftrennung durch zweidimensionale Elektrophorese.

Zur Bestimmung der molaren Ausbeuten der Oligonucleotide wurden die entsprechenden Regionen aus dem DEAE-Cellulose-Papier ausgeschnitten und die ^{32}P -Radioaktivität gemessen. Die molaren Ausbeuten und die Sequenzen der Oligonucleotide werden in Tabelle 1 zusammengefaßt.

3.2.2.1. Analyse der durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit Ribonuclease T₁ entstandenen Oligonucleotide und Mononucleotide

Analyse des Mononucleotids t₁ :

Dieses Nucleotid wurde mit RNAase T₂ inkubiert und anschließend im System A (vgl. 5.5.3.) chromatografiert, wo es als Gp identifiziert wurde.

Analyse des Oligonucleotids t₂ :

Das Oligonucleotid wurde nach der Spaltung der tRNA mit RNAase T₁ als 2'-3'-Phosphat abgespalten und hatte daher eine geringere negative Ladung als das Dinucleotid mit der 3'-Phosphatgruppe. Durch Spaltung dieses Dinucleotids mit RNAase T₂ und chromatografische Auftrennung der Mononucleotide im System B entstand 1 Mol Cp und 1 Mol m₂²Gp. Das gleiche Resultat wurde nach der Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase A und Elektrophorese im System C erhalten. Mit diesen Informationen

Nr. der Oligo- nucleotide	Sequenzen der Oligo- nucleotide	Molare Ausbeuten		Zahl der Nucleo- side
		gefunden	theoretisch	
t ₁	Gp	5,2	5	5
t ₂	C-m ² ₂ Gp	0,7	1	1
t ₃	C-U-A-C-C-A _{OH}	0,9	1	6
t ₄	C-Gp	5,5	5	10
t ₅	C-C-Gp	0,8	1	3
t ₆	C-A-Gp	2,0	2	6
t ₇	A-A-Gp	0,7	1	3
t ₈	m ¹ A-A-A-C-C-Gp	0,8	1	6
t ₁₁	D-Gp	0,9	1	2
t ₁₄	X-Yp	0,9	1	2
t ₁₇	A-U-C-Gp	1,0	1	4
t ₁₈	pA-Gp	0,7	1	2
t ₁₉	U-m ¹ G-m ² Gp	1,1	1	3
t ₂₄	A-U-m ⁷ G-D-m ⁵ C- -m ⁵ C-U-C-Gp	1,1	1	9
t ₂₉	C-U-C-A-U-t ⁶ A- -A-C-C-C-U-Gp	1,2	1	12
				75

Tab.1: Sequenzen und molare Ausbeuten der Oligonucleotide, die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase T₁ entstanden sind. Die Molangaben sind relativ zu A-U-C-Gp (= 1) angegeben. Die Daten wurden durch Auswertung der Messung der ³²P-Radioaktivität der Oligonucleotide erhalten.

konnte die Sequenz C-m₂²Gp abgeleitet werden.

Analyse des Oligonucleotids t₃ :

Die Nucleotidanalyse dieses Oligonucleotids mit RNAase T₂ (System A) ergab 1 Mol Ap, 2,8 Mol Cp und 1 Mol Up. Das Fehlen von Gp wies darauf hin, daß es sich um das 3'-terminale Ende der tRNA handelte. Die Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase A ergab nach Auftrennung der Spaltprodukte auf DEAE-Cellulose-Papier durch Elektrophorese bei pH 3,5 1,2 Mol A-Cp, 2,2 Mol Cp und 1 Mol Up. Zur Bestimmung der Reihenfolge der Nucleotide wurde das Oligonucleotid t₃ mit RNAase U₂ gespalten. Diese Ribonuclease aus *Ustilago sphaerogena* ist eine spezifische Endonuclease, die die Phosphordiester-Bindung zwischen einem Purin-3'-Phosphat und dem nächsten Nucleotid spaltet. Zur Sequenzanalyse wurden die Bedingungen so gewählt, daß die RNAase U₂ spezifisch neben dem Adenosin-3'-Phosphat spaltete.

Die zwei Spaltprodukte, die durch Spaltung des Oligonucleotids t₃ mit RNAase U₂ entstanden, wurden auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 elektrophoretisch getrennt. Die Analyse des ersten Spaltproduktes ergab je ein Mol Cp, Up und Ap; für das zweite Spaltprodukt wurden 2 Mol Cp gefunden. Die Spaltung des Oligonucleotids t₃ mit PDE aus Schlangengift ergab 2 Mol pA,

2 Mol pC und 1 Mol pU. Aus diesen Ergebnissen ließ sich die Sequenz C-U-A-C-C-A_{OH} ableiten.

Analysen der Oligonucleotide t₄, t₅ und t₇ :

Diese Oligonucleotide wurden durch Spaltung mit RNAase T₂ und Trennung der Mononucleotide im System A analysiert. Zur Kontrolle wurden die Mononucleotide zusätzlich im System C aufgetrennt. Das Resultat war identisch mit dem der Dünnschicht-Chromatografie. Die Oligonucleotide hatten folgende Sequenzen : t₄ : C-Gp, t₅ : C-C-Gp, t₇ : A-A-Gp.

Analyse des Oligonucleotids t₆ :

Durch Spaltung des Oligonucleotids t₆ mit RNAase A entstanden 2 Spaltprodukte. Diese wurden auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 3,5 elektrophoretisch getrennt. Die Nucleotidanalyse der Spaltprodukte mit RNAase T₂ (System A) ergab 1 Mol Cp für das erste Spaltprodukt und je 1 Mol Ap und Gp für das zweite Spaltprodukt. Damit ließ sich die Sequenz C-A-Gp für das Oligonucleotid t₆ ableiten.

Analyse des Oligonucleotids t₈ :

Zur Bestimmung der Nucleotide wurde das Oligonucleotid mit RNAase T₂ gespalten und die Mononucleotide chromatografisch im System B getrennt. Es wurden 0,7 Mol m¹Ap, 2 Mol Ap, 2,3 Mol Cp, 1 Mol Gp und 0,2 Mol m⁶Ap gefunden. Das m⁶Ap ist durch Umwandlung aus m¹Ap entstanden. Diese

Umwandlung wurde durch den alkalischen pH des zum Eluieren des Oligonucleotids vom DEAE-Cellulose - Papier verwendete Triäthylammonium-carbonats bewirkt. Wurde das Oligonucleotid mit 10 % Piperidin gespalten, so wandelte sich das m^1Ap vollständig in m^6Ap um.

Um das 5'-terminale Nucleotid des Oligonucleotids t_3 zu identifizieren, wurde ein Teil des Oligonucleotids mit RNAase T_2 und der restliche Teil mit PDE aus Schlangengift gespalten. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Mononucleotide im System C wurde nur bei dem mit der RNAase T_2 gespaltenen Oligonucleotid 0,8 Mol m^1Ap gefunden.

Zur Bestimmung der Nucleotidsequenz wurde das Oligonucleotid t_8 mit RNAase U_2 gespalten ; die zwei entstandenen Spaltprodukte wurden auf DEAE-Cellulose-Papier in 7 % Ameisensäure elektrophoretisch getrennt (Abb.11). Die Nucleotidanalyse des ersten Spaltproduktes mit RNAase T_2 ergab 2 Mol Ap, 0,7 Mol m^1Ap und 0,3 Mol m^6Ap , während das zweite Spaltprodukt aus 2 Mol Cp und 1 Mol Gp zusammengesetzt war. Die Mononucleotide wurden sowohl elektrophoretisch im System C, als auch chromatografisch im System B identifiziert. Aus diesen Ergebnissen wurde die Sequenz $m^1A-A-A-C-C-Gp$ für das

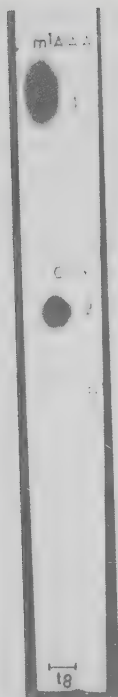


Abb. 11 : Autoradiografie
der aus der Spaltung des
Oligonucleotids t_8 mit
RNAase U_2 entstandenen
Spaltprodukte nach elektro-
phoretischer Auftrennung.

Oligonucleotid t_8 ermittelt.

Analyse des Oligonucleotids t_{11} :

Nach Spaltung dieses Oligonucleotids mit RNAase T_2 und
chromatografischer Auftrennung der Mononucleotide im
System A wurden 1 Mol Dp und 1 Mol Gp gefunden. Dieses
Oligonucleotid hat daher die Sequenz D-Gp.

Analyse des Oligonucleotids t_{14} :

Dieses Oligonucleotid zeigte einige ungewöhnliche Eigenschaften :

1. Unter den Bedingungen der Totalspaltung war dieses Oligonucleotid resistent gegenüber RNAase T_2 und 10 % Piperidin.
2. Dieses Oligonucleotid wurde nicht durch PDE aus Schlangengift und RNAase A hydrolysiert.

Die Struktur dieses Oligonucleotids wurde nicht bestimmt, aber es scheint identisch mit dem Oligonucleotid zu sein, das RajBhandary et al. in der tRNA^{Met}_f aus Bäckerhefe gefunden haben (35). Dort wurde es als A*-Gp bezeichnet, da das Spektrum ($\mu_{\max}$ bei pH 7,0 war 257 nm) dem Spektrum von A-Gp ähnlich ist. Chromatografiert man dieses Oligonucleotid an DEAE-Cellulose, so verhält es sich wie ein Tetranucleotid. Wahrscheinlich sind Substitutionen am Purinring vorhanden, die eine negative Ladung haben. Behandelt man das Oligonucleotid eine Stunde bei 100 Grad mit 1 N HCl, so entsteht 1 Mol Adenin und 1 Mol Guanin.

Analyse des Oligonucleotids t_{17} :

Nach Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase T_2 und Auftrennung der Mononucleotide im System A wurden 0,9 Mol Ap, 0,9 Mol Up, 1,1 Mol Cp und 1 Mol Gp gefunden. Dagegen entstanden nach Spaltung des Oligonucleo-

tids mit RNAase A und nachfolgender Auftrennung der Spaltprodukte auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 3,5 1 Mol A-Up, 1 Mol Cp und 1 Mol Gp. Zur Bestimmung des 5'-terminalen Nucleotids wurde das Oligonucleotid t_{17} mit PDE aus Schlangengift vollständig hydrolysiert. Da nach chromatografischer Auftrennung der Mononucleotide im System A kein Ap gefunden werden konnte, ließ sich zusammen mit den übrigen Daten die Sequenz A-U-C-Gp ableiten.

Analyse des Oligonucleotids t_{18} :

Durch Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase T_2 entstanden zwei Spaltprodukte, die im System C elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Eines dieser Spaltprodukte wurde als Gp identifiziert. Das andere Spaltprodukt wurde durch sein elektrophoretisches Verhalten im System C identifiziert. Der R_{Up} -Wert von 1,1 weist auf pAp hin. Um dies sicherzustellen, wurde dieses Spaltprodukt vom Elektrophoresepapier eluiert und auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 erneut elektrophoretisiert, wobei sich ein R_{Gp} -Wert von 0,89 ergab, der ebenfalls mit dem von pAp übereinstimmt. Zur Kontrolle wurde das 3'-terminale Phosphat des Oligonucleotids t_{18} abgespalten und das dephosphorylierte Oligonucleotid wurde mit PDE aus Schlangengift vollständig hydrolysiert. Nach Auftrennung der Spaltprodukte im System A ergab

die Analyse 1 Mol pA und 1 Mol pG. Die aus diesen Ergebnissen abgeleitete Sequenz heißt pA-Gp. Die 5'-Phosphatgruppe des Oligonucleotids t_{18} weist darauf hin, daß es sich um das 5'-Ende der tRNA handelt.

Analyse des Oligonucleotids t_{19} :

Dieses Oligonucleotid wurde mit RNAase T_2 gespalten und die Mononucleotide sowohl im System A, als auch im System C aufgetrennt. Es wurden 0,9 Mol Up, 0,9 Mol m^1Gp und 1 Mol m^2Gp gefunden. Zur Aufklärung des 3'-terminalen Nucleotids wurde das 3'-terminale Phosphat abgespalten und das dephosphorylierte Oligonucleotid mit RNAase T_2 hydrolysiert. Nach Auftrennung der Mononucleotide im System A wurden Up und m^1Gp gefunden. Zur Analyse des 5'-terminalen Nucleotids wurde das Oligonucleotid t_{19} mit PDE aus Schlangengift vollständig hydrolysiert und die Mononucleotide im System C aufgetrennt. Da kein Up gefunden wurde, läßt sich zusammen mit den oben genannten Ergebnissen die Sequenz $U-m^1G-m^2Gp$ für das Oligonucleotid t_{19} ableiten.

Analyse des Oligonucleotids t_{24} :

Nach der Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase A und Elektrophorese der Spaltprodukte auf DEAE-Cellulose-Papier in 7 % Ameisensäure wurden folgende Spaltproduk-

te aufgefunden (Abb. 12) : 1 Mol A-Up, 1 Mol m⁷Gp, 2 Mol m⁵Cp, 1 Mol Up, 1 Mol Cp und 1 Mol Gp. Die Identifizierung erfolgte durch Spaltung der Spaltprodukte mit RNAase T₂ und Auftrennung der Mononucleotide im System C. Zur Kontrolle wurden die Mononucleotide vom Papier eluiert und im System A chromatografiert.

Zur Bestimmung der Reihenfolge der Nucleotide am 5'-Ende des Oligonucleotids wurde dieses mit PDE aus Milz partiell abgebaut und die Spaltprodukte elektrophoretisch auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 getrennt (Abb. 13). Die Produkte des partiellen Abbaus bildeten aufeinanderfolgende Flecken auf der Autoradiografie. Ein erster Hinweis auf die Reihenfolge der Nucleotide am 5'-Ende ist der M-Wert (56).

Er ergibt sich aus dem Verhältnis des Abstandes eines Oligonucleotids von seinem um ein Nucleotid verkürzten Spaltprodukt zum Abstand des Oligonucleotids vom Startpunkt der Elektrophorese.

Dieser Wert ergab die Reihenfolge Ap, Up am 5'-terminalen Ende des Oligonucleotids. Zur Kontrolle wurden die Spaltprodukte mit RNAase T₂ hydrolysiert und die Mononucleotide im System A aufgetrennt. Aus dem Molverhältnis der Mononucleotide der einzelnen Spaltprodukte konnte ebenfalls auf die Reihenfolge Ap, Up

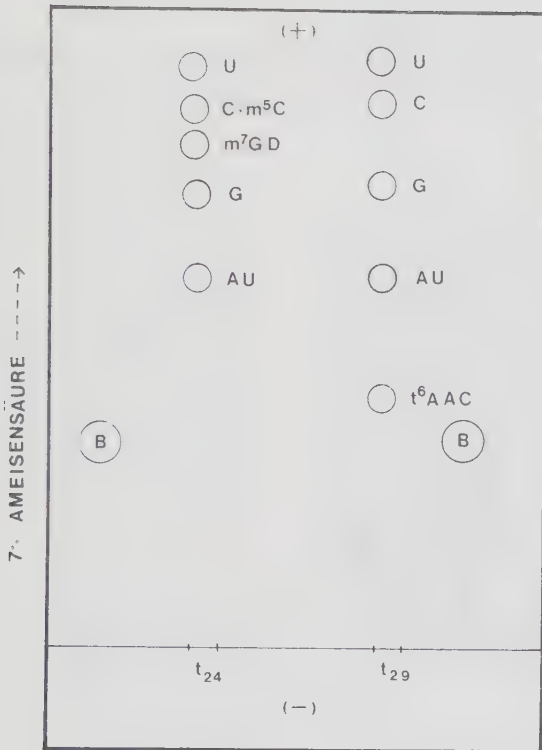


Abb. 12 : Elektrophorese der durch Spaltung der Oligonucleotide t_{24} und t_{29} mit RNAase A entstandenen Spaltprodukte.

am 5'-Ende des Oligonucleotids t_{24} geschlossen werden.

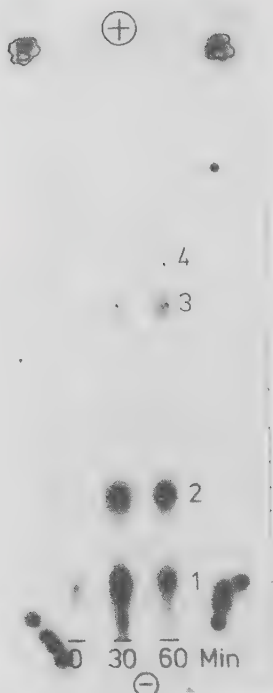


Abb. 13 : Autoradiografie
der durch partiellen Abbau
des Oligonucleotids t_{24} mit
PDE aus Milz entstandenen
Spaltprodukte nach elek-
trophoretischer Auftrennung.
Nr. 1 ist das ungespaltene
Oligonucleotid, Nr. 2, 3, 4
sind die Abbauprodukte.

Durch partiellen Abbau des Oligonucleotids t_{24} mit PDE
aus Schlangengift entstanden drei Abbauprodukte, die auf
DEAE-Cellulose-Papier bei pH 3,5 elektrophoretisch ge-
trennt wurden. Die Bestimmung des M-Wertes (56) und
die Nucleotidanalyse der beiden Abbauprodukte zeigte,
daß sich am 3'-Ende des Oligonucleotids die Nucleotide
Gp und Cp befinden.

Zur Aufklärung der Reihenfolge der Nucleotide in der Mitte des Oligonucleotids wurde dieses mit dem CMCT-Reagens modifiziert und anschließend mit RNAase A gespalten. Die Spaltprodukte wurden im System C elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 14) .



Abb. 14 : Elektrophoretische Auftrennung der durch Spaltung des CMCT-modifizierten Oligonucleotids mit RNAase A entstandenen Spaltprodukte.
(mod.) bedeutet : modifiziertes Spaltprodukt.

Die Zusammensetzung der Spaltprodukte wurde durch Spaltung mit 10 % Piperidin und Auftrennung der Mononucleotide im System A ermittelt. Das Piperidin bewirkte sowohl die Abspaltung des CMCT, als auch die Hydrolyse der Spaltprodukte (Tab. 2).

Spalt- produkt Nr.	Nucleotid- analyse	abgeleitete Sequenz
1	Ap, Up	A-Up
2	m ⁵ Cp	m ⁵ Cp
3	Ap, Up, m ⁷ Gp Dp, m ⁵ Cp	A-U-m ⁷ G-D-m ⁵ Cp (+)
4	Up, Cp	U-Cp
5	m ⁷ Gp, Dp, m ⁵ Cp	m ⁷ G-D-m ⁵ Cp (+)
6	Gp	Gp

Tab. 2 : Nucleotidanalyse der Spaltprodukte, die durch Spaltung des mit CMCT-modifizierten Oligonucleotids t₂₄ mit RNAase A entstanden.

(+) Zur Ableitung der Sequenzen dieser Spaltprodukte wurden die Ergebnisse der Spaltung des Oligonucleotids t₂₄ mit RNAase A und des partiellen Abbaus des Oligonucleotids mit PDE aus Milz verwendet.

Das Spaltprodukt Nr. 1 entstand durch unvollständige Modifizierung des Oligonucleotids t₂₄ mit CMCT. Mit diesen Informationen war es möglich, für das Oligonucleotid t₂₄ die Sequenz A-U-m⁷G-D-m⁵C-m⁵C-U-C-Gp abzuleiten. In Abb. 15 werden die Überlappungsstellen der Spaltprodukte und die daraus abgeleitete Sequenz des Oligonucleotids t₂₄ gezeigt.



Abb. 15 : Überlappungen der durch Spaltung des Oligonucleotids t_{24} mit verschiedenen Nucleasen entstandenen Spaltprodukte.

_____ : RNAase A	 : PDE aus Schlangengift
----- : PDE aus Milz	xxxxx : RNAase A nach CMCT
	Modifizierung

Analyse des Oligonucleotids t_{29} :

Durch Spaltung des Oligonucleotids t_{29} mit RNAase A entstanden fünf Spaltprodukte, die auf DEAE-Cellulose-Papier in 7 % Ameisensäure aufgetrennt wurden (Abb. 12), Die Spaltprodukte wurden mit RNAase T₂ gespalten und die Mononucleotide im System B aufgetrennt. Durch Messung der Radioaktivität wurden die in Tabelle 3 gezeigten Ausbeuten der Spaltprodukte bestimmt. Zur Bestimmung der Reihenfolge der Nucleotide im Spaltprodukt Nr. 5 (vgl. Tab. 3) wurde das 3'-terminale Phosphat abgespalten und das dephosphorylierte Spaltprodukt mit PDE aus Schlangengift hydrolysiert. Die

Spaltprodukt Nr.	Molzahlen der Mononucleotide	
	gefunden	theoretisch
1	2,3 Up	2 Up
2	4,2 Cp	4 Cp
3	1,0 Gp	1 Gp
4	0,8 Ap, 1 Up	1 Ap, 1 Up
5	0,7 t ⁶ Ap,	1 t ⁶ Ap,
	1,0 Ap	1 Ap,
	1,0 Cp	1 Cp

Tab. 3: Nucleotidanalyse der durch Spaltung des Oligonucleotids t₂₉ mit RNAase A entstandenen Spaltprodukte.

Mononucleotide wurden im System C aufgetrennt. Da bei der Spaltung des Spaltprodukts mit PDE aus Schlangengift kein t⁶Ap gefunden wurde, ließ sich für das Spaltprodukt Nr. 5 die Sequenz t⁶A-A-Cp ableiten.

Zur weiteren Aufklärung der Sequenz des Oligonucleotids t₂₉ war es notwendig, größere Spaltprodukte zu bekommen. Durch Spaltung mit RNAase U₂ entstanden fünf Spaltprodukte, von denen vier analysiert wurden. Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 (Abb. 16).

Die Nucleotidanalyse (RNAase T₂ und Auftrennung der Mononucleotide im System B) lieferte die in Tab.4 gezeigten Ergebnisse. Aus Veröffentlichungen über RNAase U₂ ist bekannt, daß dieses Enzym die Phosphordiester-Bindung neben dem Adenosin manchmal nicht spaltet (55), so wie dies bei den Spaltprodukten Nr. 1 und Nr. 4 der Fall war.

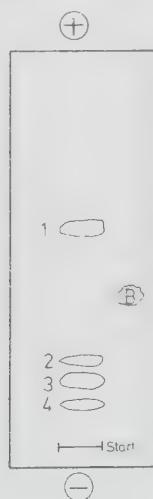


Abb. 16 : Diagramm der elektrophoretischen Auftrennung des durch Spaltung des Oligonucleotids t_{29} mit RNAase U₂ entstanden und mit RNAase T₂ analysierten Spaltprodukte.

Zur Ermittlung der Reihenfolge der Nucleotide am 5'-Ende des Oligonucleotids t_{29} wurde dieses mit PDE aus Milz partiell hydrolysiert. Die Spaltprodukte wurden auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 elektrophoretisch getrennt. Die Berechnungen der M-Werte

(56) ergaben die Reihenfolge der Nucleotide Cp, Up, Cp in der 5'-3'-Richtung des Oligonucleotids t_{29} .

Spalt- produkt Nr.	Molzahlen der gefunden	Mononucleotide theoretisch	abgeleitete Sequenz
1	1,9 Cp	2 Cp	C-U-C-Ap
	1,3 Up	1 Up	
	1,0 Ap	1 Ap	
2	3,1 Cp	3 Cp	C-C-C-U-Gp
	1,0 Up	1 Up	
	1,0 Gp	1 Gp	
3	2,2 Cp	2 Cp	C-U-C-A-U- t^6 Ap
	2,1 Up	2 Up	
	1,2 Ap	1 Ap	
	1,0 t^6 Ap	1 t^6 Ap	
4	2,8 Cp	3 Cp	U- t^6 A-A-C- -C-C-Gp
	1,2 Ap	1 Ap	
	2,0 Up	2 Up	
	0,8 t^6 Ap	1 t^6 Ap	
	1,0 Gp	1 Gp	

Tab. 4 : Nucleotidanalyse und abgeleitete Sequenz der durch Spaltung des Oligonucleotids t_{29} mit RNAase U_2 entstandenen Spaltprodukte.

Zur Aufklärung der Sequenz der Nucleotide des Oligonucleotids t_{29} in Richtung 3'-5' wurde das 3'-terminale Phosphat abgespalten und das dephosphorylierte Oligonucleotid mit PDE aus Schlangengift partiell abgebaut. Die Berechnungen der M-Werte (56) ergaben die Reihenfolge Gp, Up, Cp am 3'-Ende des Oligonucleotids. In Abb. 17 werden die Überlappungsstellen der Spaltprodukte und die Sequenz des Oligonucleotids t_{29} gezeigt.

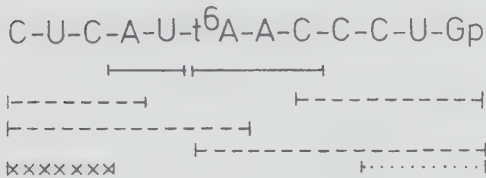


Abb. 17 : Überlappungen der durch Spaltung des Oligonucleotids t_{29} mit verschiedenen Nucleasen entstandenen Spaltprodukte.

_____ : mit RNAase A. : mit PDE aus Schlangengift.
 ----- : mit RNAase U_2 . xxxxxx : mit PDE aus Milz.

3.2.3. Spaltung von tRNA und Oligonucleotiden mit Ribonuclease A

Die RNAase A aus Rinderpankreas ist eine Endonuclease, die unter geeigneten Bedingungen spezifisch die Phosphordiester-Bindung neben den Nucleotiden Cp, Up und einigen modifizierten Pyrimidinphosphaten spaltet. Als Intermediärprodukt entsteht ein cyclisches 2'-3'-Pyrimidinphosphat (57).

Die ^{32}P -markierte tRNA^{Met_f} (3×10^6 Imp/Min) wurde mit RNAase A gespalten und die entstandenen Spaltprodukte wurden durch zweidimensionale Elektrophorese nach Sanger et al. (34) getrennt. In Abb. 18 wird die Autoradiografie der aufgetrennten Oligonucleotide gezeigt. In Abb. 19 sind Numerierung und Sequenzen der Oligonucleotide aufgezeigt. Zur Bestimmung der molaren Ausbeuten der Oligonucleotide wurden die entsprechenden Regionen aus dem DEAE-Cellulose Papier ausgeschnitten und die Radioaktivität gemessen. Molare Ausbeuten sowie die Sequenzen der Oligonucleotide sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Oligonucleotide 3a und 5a, 7 und 7a, 14 und 15 und 16 konnten nur dann voneinander getrennt werden, wenn man die Elektrophorese unter Bedingungen durchführte, unter denen die Oligonucleotide 1, 1a, 2 und 2a in den Anodenpuffer wanderten.



Abb. 18 : Autoradiografie der Oligonucleotide, die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase A entstanden und durch zweidimensionale Elektrophorese aufgetrennt worden waren.

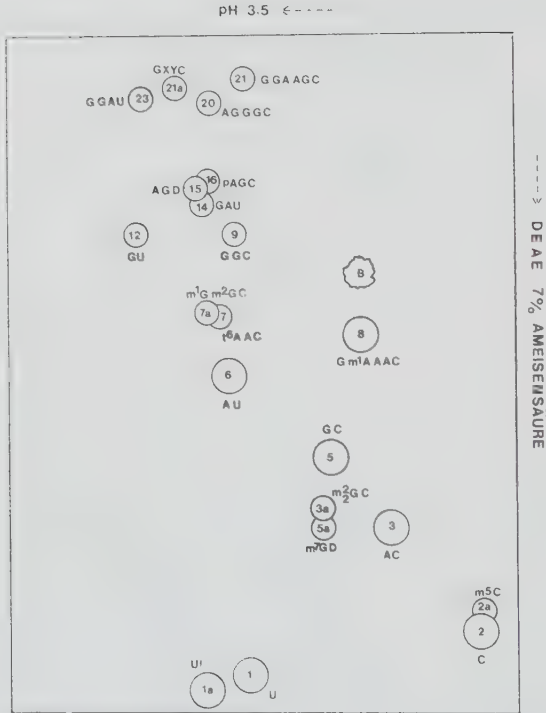


Abb. 19 : Diagramm mit den Sequenzen der Oligonucleotide, die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase A entstanden und durch zweidimensionale Elektrophorese aufgetrennt worden waren. Die Zahlen geben die Nomenklatur an, wie sie im Text verwendet wird.

Nummern der Oligo- nucleotide	Sequenzen der Oligo- nucleotide	Molare Ausbeuten ge- funden	theo- retisch	Zahl der Nucleo- side
p _{1,1a}	Up, Up! (+)	4,7	4	4
p ₂	Cp	10,4	8	8
p _{2a}	m ⁵ Cp	1,8	2	2
p ₃	A-Cp	1,1	1	2
p _{3a}	m ² G-Cp	0,8	1	2
p ₅	G-Cp	4,8	4	8
p _{5a}	m ⁷ G-Dp	0,9	1	2
p ₆	A-Up	0,8	1	2
p ₇	t ⁶ A-A-Cp	1,0	1	3
p _{7a}	m ¹ G-m ² G-Cp	1,0	1	3
p ₈	G-m ¹ A-A-A-Cp	0,9	1	5
p ₉	G-G-Cp	1,2	1	3
p ₁₂	G-Up	1,0	1	2
p ₁₄	G-A-Up	1,0	1	3
p ₁₅	A-G-Dp	1,0	1	3
p ₁₆	pA-G-Cp	1,3	1	3
p ₂₀	A-G-G-G-Cp	1,0	1	5
p ₂₁	G-G-A-A-G-Cp	1,1	1	6
p _{21a}	G-X-Y-Cp	1,2	1	4
p ₂₃	G-G-A-Up	1,0	1	4
	A _{OH}		1	1
				75

Tab. 5 : Sequenzen und molare Ausbeuten der Oligonucleotide, die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase A entstanden sind. Die Molangaben sind relativ zu A-G-G-G-Cp (= 1) angegeben. (+)Up! : cyclisches Uridinphosphat.

3.2.3.1. Analyse der durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit Ribonuclease A entstandenen Oligonucleotide und Mononucleotide

Analyse der Mononucleotide p₁, p₂ und p_{2a}:

Diese Mononucleotide wurden durch Elektrophorese im System C aufgetrennt. Nach Bestimmung der molaren Ausbeuten wurden für p₁ : 4,7 Mol Up, für p₂ : 10,4 Mol Cp und für p_{2a} : 1,8 Mol m⁵Cp gefunden. Die molaren Ausbeuten von Up und Cp sind größer, als es den theoretischen entspricht, da diese beiden Nucleotide häufig durch unspezifische Spaltungen mit RNAase A entstehen (58).

Analyse der Oligonucleotide p₃, p₅ und p₆ :

Die Dinucleotide A-Cp, G-Cp und A-Up wurden aufgrund ihrer Position auf dem Fingerprint und durch Nucleotidanalyse mit RNAase T₂ und Auftrennung der Mononucleotide im System A identifiziert.

Analyse des Oligonucleotids p_{3a} :

Dieses Oligonucleotid wurde mit RNAase T₂ gespalten; ein aliquoter Teil der Spaltung wurde im System C aufgetrennt. Nach Bestimmung der molaren Ausbeuten wurden 1 Mol m₂²Gp und 1 Mol Cp gefunden. Zur weiteren Identifizierung von m₂²Gp wurde ein aliquoter Teil der Spal-

tung im System A aufgetrennt und die R_{Up} -Werte der Mononucleotide berechnet. Das Ergebnis stimmte mit dem der Elektrophorese im System C überein. Mit diesen Ergebnissen wurde für das Oligonucleotid p_{3a} die Sequenz m_2^2G-Cp abgeleitet.

Analyse des Oligonucleotids p_{5a} :

Durch Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase T_2 entstanden 1 Mol m^7Gp und 1 Mol Dp , die im System A getrennt wurden. Da m^7Gp in diesem System nicht eindeutig identifiziert werden konnte, wurde das Mononucleotid eluiert und durch Elektrophorese im System C nachgewiesen. Die Sequenz des Oligonucleotids p_{5a} ist daher m^7G-Dp .

Analyse des Oligonucleotids p_7 :

Dieses Oligonucleotid wurde mit RNAase T_2 gespalten und die Spaltprodukte im System C getrennt. Da die Position des t^6Ap in diesem System nicht eindeutig zuzuordnen war, wurden die Mononucleotide eluiert und im System B chromatografiert. Es wurden 1 Mol Ap , 1 Mol t^6Ap und 1 Mol Gp gefunden. Zur Bestimmung des 5'-terminalen Nucleotids wurde das Oligonucleotid nach Abspaltung des 3'-terminalen Phosphats mit PDE aus Schlangengift hydrolysiert und die Hydrolyseprodukte im System B getrennt.

Es wurden je 1 Mol pC und pA gefunden, jedoch kein $t^6\text{Ap}$.
Die ermittelte Sequenz ist daher $t^6\text{A-A-Cp}$.

Analyse des Oligonucleotids p_{7a} :

Ein aliquoter Teil dieses Oligonucleotids wurde mit RNAase T_2 und ein zweiter aliquoter Teil des Oligonucleotids mit PDE aus Schlangengift gespalten. Die jeweiligen Spaltprodukte wurden sowohl durch Elektrophorese im System C als auch durch Chromatografie im System A aufgetrennt. Bei dem mit RNAase T_2 gespaltenen Teil des Oligonucleotids wurden 1 Mol $m^1\text{Gp}$, 1 Mol $m^2\text{Gp}$ und 1 Mol Cp gefunden. Durch Spaltung des Oligonucleotids mit PDE aus Schlangengift entstanden 1 Mol $m^2\text{Gp}$ und 1 Mol pCp. Aus diesen Daten ließ sich für das Oligonucleotid p_{7a} die Sequenz $m^1\text{G-m}^2\text{G-Cp}$ ableiten.

Analyse des Oligonucleotids p_8 :

Durch Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase T_2 entstanden 1 Mol Gp und ein Spaltprodukt mit 4 Phosphatgruppen, das durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier in 7 % Ameisensäure abgetrennt wurde. Ein aliquoter Teil des letztgenannten Spaltprodukts wurde mit RNAase T_2 hydrolysiert, während der restliche Teil mit PDE aus Schlangengift gespalten wurde. Nach Auftrennung der Mononucleotide, die durch Spaltung

des Oligonucleotids mit RNAase T_2 entstanden waren, im System C wurden 1 Mol m^1Ap , 2 Mol Ap und 1 Mol Cp gefunden, während nach der Spaltung des Oligonucleotids mit PDE aus Schlangengift nach der Trennung der Spaltprodukte im System C 2 Mol pA und 1 Mol pCp gefunden wurden. Mit diesen Informationen konnte für das Oligonucleotid p_8 die Sequenz $G-m^1A-A-A-Cp$ abgeleitet werden.

Analysen der Oligonucleotide p_9 und p_{12} :

Die Sequenz dieser Oligonucleotide wurde durch Spaltung mit RNAase T_2 und chromatografische Auftrennung der Mononucleotide im System A und Bestimmung der molaren Ausbeuten der Spaltprodukte analysiert.

Für das Oligonucleotid p_9 wurde die Sequenz $G-G-Cp$ gefunden, während für das Oligonucleotid p_{12} die Zusammensetzung $G-Up$ ermittelt wurde.

Analysen der Oligonucleotide p_{14} und p_{15} :

Diese Oligonucleotide wurden mit RNAase T_1 gespalten und die Spaltprodukte auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 durch Elektrophorese getrennt. Die Nucleotidanalyse der Spaltprodukte mit RNAase T_2 und Chromatografie der Mononucleotide im System A ergab nach quantitativer Auswertung für das Oligonucleotid p_{14} die Sequenz $G-A-Up$ und für das Oligonucleotid p_{15} $A-G-Dp$.

Analyse des Oligonucleotids p₁₆ :

Bei der Chromatografie dieses Oligonucleotids auf DEAE-Cellulose-Papier war zuweilen eine Bildung von Streifen zu beobachten, was wahrscheinlich auf die zusätzliche 5'-Phosphatgruppe zurückzuführen war (56). Aufgrund dieses chromatografischen Verhaltens war das Oligonucleotid p₁₆ teilweise mit dem Oligonucleotiden p₁₄ und p₁₅ verunreinigt. Die Sequenzanalyse erfolgte durch Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase T₁ und elektrophoretische Auftrennung der Spaltprodukte auf DEAE-Cellulose-Papier in 7 % Ameisensäure. Es entstanden 2 Spaltprodukte, die mit RNAase T₂ gespalten wurden; die Mononucleotide wurden im System C aufgetrennt. Es zeigte sich, daß das Spaltprodukt Nr. 1 ein Mol Cp war, während das Spaltprodukt Nr. 2 aus 1 Mol pAp und 1 Mol Gp zusammengesetzt war. Da der R_{Up}-Wert (56) für pAp (1,05) sehr ähnlich dem R_{Up}-Wert von pCp ist (1,00), wurden die Mononucleotide zur Kontrolle durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 getrennt. Aufgrund des R_{Gp}-Wertes von 0,81 wurde das pAp eindeutig zugeordnet. Die Sequenz des Oligonucleotids lautet daher pA-G-Cp.

Analyse des Oligonucleotids p₂₀ :

Dieses Oligonucleotid wurde mit RNAase T₁ gespalten und die Spaltprodukte durch Elektrophorese auf DEAE-

Cellulose-Papier bei pH 1,9 aufgetrennt. Die 3 Spaltprodukte wurden nach Spaltung mit RNAase T_2 und Chromatografie der Mononucleotide im System A als 1 Mol A-Up, 2 Mol Gp und 1 Mol Cp identifiziert. Zur Bestimmung des 5'-terminalen Nucleotids wurde das Oligonucleotid p_{20} nach Abspaltung des 3'-Phosphats mit PDE aus Schlangengift hydrolysiert. Nach chromatografischer Auftrennung der Mononucleotide im System A wurden pC und pG gefunden, aber kein pA. Die Reihenfolge des Oligonucleotids p_{20} lautet demnach A-G-G-G-Cp.

Analyse des Oligonucleotids p_{21} :

Zur Bestimmung der Sequenz dieses Oligonucleotids wurde ein aliquoter Teil mit RNAase T_1 gespalten und die Spaltprodukte durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 aufgetrennt. Es wurden 2 Mol Gp, 1 Mol Cp und ein Spaltprodukt mit 3 Phosphatgruppen aufgefunden. Die Zusammensetzung des letztgenannten Spaltproduktes war 2 Mol Ap und 1 Mol Gp, wie durch Nucleotidanalyse mit RNAase T_2 und Auftrennung der Mononucleotide im System A ermittelt wurde. Durch partiellen Abbau mit PDE aus Milz entstanden zwei größere Spaltprodukte, die durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier getrennt wurden. Die Nucleotidanalyse der Spaltprodukte (Spaltung der Spaltprodukte mit RNAase T_2 , Auftrennung der Mono-

nucleotide im System A) ergab für das erste Spaltprodukt 2 Mol Gp, 2 Mol Ap und 1 Mol Cp. Für das zweite Spaltprodukt wurden 2 Mol Ap, 1 Mol Gp und 1 Mol Cp gefunden. Aus diesen Daten ließ sich für das Oligonucleotid p_{21} die Sequenz G-G-A-A-G-Cp ableiten.

Analyse des Oligonucleotids p_{21a} :

Bei der Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase T_1 entstanden drei Spaltprodukte, die durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 aufgetrennt wurden. Die Nucleotidanalyse dieser Spaltprodukte mit RNAase T_2 und Auftrennung der Hydrolysenprodukte im System A ergab 1 Mol Gp, 1 Mol Cp und ein Dinucleotid unbekannter Zusammensetzung. Dieses unbekannte Dinucleotid X-Yp wurde als X-Yp im Oligonucleotid t_{14} gefunden (vgl. 4.2.). Die Identifizierung dieses Dinucleotids erfolgte nach dem Eluieren von DEAE-Cellulose-Papier durch Chromatografie im System A. Zur Bestimmung des 5'-terminalen Nucleotids des Oligonucleotids p_{21a} wurde dieses mit PDE aus Schlangengift gespalten. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 wurden 1 Mol pCp (Identifizierung aufgrund des R_{Up} -Wertes], 1 Mol pX-Y, aber kein pG gefunden. Die Reihenfolge der Nucleotide lautete daher : G-X-Y-Cp.

Analyse des Oligonucleotids p_{23} :

Bei der Spaltung des Oligonucleotids mit RNAase T_1 entstanden zwei Spaltprodukte, die durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 aufgetrennt wurden. Wie durch Nucleotidanalyse der Spaltprodukte mit RNAase T_2 und Auftrennung der Mononucleotide im System A nachgewiesen wurde, bestand das Spaltprodukt Nr.1 aus 2 Mol Gp, während das Spaltprodukt Nr. 2 aus 1 Mol Ap und 1 Mol Up zusammengesetzt war. Aus diesen Ergebnissen ließ sich die Sequenz G-G-A-Up für das Oligonucleotid p_{23} ableiten.

3.2.4. Spaltung der tRNA^{Met_f} mit Ribonuclease T₁
unter limitierenden Bedingungen

Zur Ableitung der vollständigen Sequenz der tRNA^{Met_f} war es notwendig, nach Spaltbedingungen zu suchen, unter denen eine Anzahl von größeren Fragmenten entsteht. Es zeigte sich, daß solche durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase T₁ unter limitierenden Bedingungen erhalten werden konnten. Die Trennung der Fragmente erfolgte nach einer von Sanger et al. entwickelten Methode (59). Die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase T₁ erhaltenen Fragmente wurden zunächst durch Elektrophorese auf einem Celluloseacetat-Streifen bei pH 3,5 getrennt. Nach dem Transfer der aufgetrennten Fragmente auf eine DEAE-Cellulose Dünnschicht-Folie oder auf eine Dünnschicht-Folie mit einer Mischschicht aus DEAE-Cellulose und cellulose (vgl. 5.5.) wurde in der zweiten Richtung mit einer Lösung von Hefe-RNA und Harnstoff in Wasser chromatografiert. Bei dieser Chromatografie werden die adsorbierten ³²P-markierten Fragmente durch die im Laufmittel enthaltenen tRNAs und Oligonucleotide von der DEAE-Cellulose verdrängt. Abb. 20 ist die schematische Darstellung der Positionen der Fragmente, die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase T₁ unter limitierenden Bedingungen erhalten worden waren, nach ihrer Auftrennung an DEAE-Cellu-

lose. Abb. 21 zeigt die Positionen der Fragmente, die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} (aus einer anderen Präparation) mit RNAase T₁ unter limitierenden Bedingungen erhalten worden waren, nach ihrer Auftrennung an einer Mischschicht von DEAE-Cellulose und Cellulose.

Nach der Elution der Fragmente von der DEAE-Cellulose wurden diese mit RNAase T₁ vollständig hydrolysiert und die entstandenen Spaltprodukte durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 aufgetrennt. Die Identifizierung dieser Spaltprodukte erfolgte teilweise aufgrund ihrer Position auf dem "Fingerprint" und teilweise durch Nucleotidanalyse mit RNAase T₂. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Da einige Sequenzen nur einmal vorhanden sind und die modifizierten Nucleotide die Zuordnung der Fragmente erleichtern, konnte fast die ganze Sequenz der tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe abgeleitet werden. Die Positionen der Nucleotide 4,5 und 67,68 konnten aufgrund dieser Daten nicht festgelegt werden. In Abb. 22 ist die lineare Anordnung der Nucleotide der tRNA^{Met_f}, sowie die Position der Oligonucleotide, die durch Spaltung der tRNA mit den RNAasen T₁ und A entstanden sind, gezeigt. Weiterhin werden die Fragmente, die durch Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase T₁ unter limitierenden Bedingungen entstanden sind, in dieser Übersicht aufgeführt.

Nummer des Fragments	Oligonucleotide, die durch Spaltung des Fragments mit RNAase T ₁ entstanden sind
T ₁	C-Gp, C-m ² ₂ Gp
T ₂	C-Gp, C-C-Gp
T ₃	Gp, Gp, Gp, C-Gp, C-m ² ₂ Gp, A-A-Gp, C-A-Gp
T ₄	Gp, Gp, C-Gp, C-Gp, X-Yp, A-U-C-Gp, m ¹ A-A-A-C-C-Gp
T ₅	C-Gp, C-C-Gp, U-m ¹ G-m ² Gp, pA-Gp
T ₆	C-Gp, C-Gp, D-Gp, C-C-Gp, C-A-Gp, U-m ¹ G-m ² Gp, pA-Gp
T ₇	C-Gp, C-Gp, C-C-Gp, C-A-Gp, U-m ¹ G-m ² Gp, pA-Gp
T ₈	Gp, A-U-C-Gp, m ¹ A-A-A-C-C-Gp, A-U-m ⁷ G-D- -m ⁵ C-m ⁵ C-U-C-Gp,
T ₉	Gp, Gp, C-Gp, X-Yp, A-U-C-Gp, m ¹ A-A- -A-C-C-Gp, C-U-C-A-U-t ⁶ A-A-C-C-C-U-Gp, A-U-m ⁷ G-D-m ⁵ C-m ⁵ C-U-C-Gp
T ₁₀	X-Yp, m ¹ A-A-A-C-C-Gp
T ₁₁	Gp, C-Gp, D-Gp, A-A-Gp
T ₁₂	A-U-C-Gp, m ¹ A-A-A-C-C-Gp
T ₁₃	Gp, Gp, C-Gp, C-m ² ₂ Gp, C-A-Gp, C-U-C-A-U-t ⁶ A-A-C-C-C-U-Gp
T ₁₄	Gp, Gp, C-Gp, X-Yp, A-U-C-Gp, m ¹ A-A-A-C-C-Gp, C-U-A-C-C-A _{OH}

Tab. 6 : Analyse einiger Fragmente, die durch Spaltung der
tRNA^{Met}_f mit RNAase T₁ unter limitierenden Bedingungen
entstanden sind.

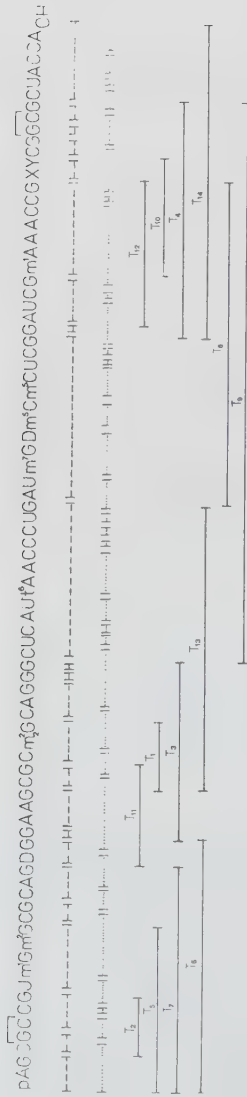


Abb. 22 : Primärstruktur der tRNA Met_f aus Brauereihefe

- : Oligonucleotide, die durch Spaltung der tRNA mit RNAase T_1 entstanden sind.
: Oligonucleotide, die durch Spaltung der tRNA mit RNAase A entstanden sind.
 _____: Fragmente, die durch Spaltung der tRNA mit RNAase T_1 unter limitierenden Bedingungen entstanden sind.
 [] : Die Positionen der Nucleotide in den Klammern wurden nicht bestimmt.

4. Diskussion der Ergebnisse :

Mit Hilfe der Sequenzanalyse der tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe wurde gezeigt, daß die tRNA aus 75 Nucleotiden zusammengesetzt ist, von denen 12 modifiziert sind (je 2 Mol Dp und m⁵Cp, je 1 Mol m¹Gp, m²Gp, m²₂Gp, m⁷Gp, m¹Ap, t⁶Ap und ein Dinucleotid unbekannter Zusammensetzung (X-Yp)).

Faltet man diese Nucleotidkette der tRNA^{Met_f} zu einer zweidimensionalen Struktur, wie sie von Holley et al. für tRNAs vorgeschlagen wurde (51), so erhält man die tRNA^{Met_f} in Kleeblattform. Dieses Modell wird heute allgemein für die zweidimensionale Darstellung von tRNAs verwendet. In Abb. 23 wird die tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe in dieser Sekundärstruktur gezeigt.

In der Zwischenzeit wurden von RajBhandary et al. die vollständige Sequenz der Initiator-tRNA aus Bäckerhefe (35), von Clark et al. die Sequenz der tRNA^{Met_f} aus P₃-Myeloma Zellen (36) und von Petrissant et al. die Sequenzen der Initiator-tRNAs aus der Brustdrüse des Schafes und aus Rattenleber veröffentlicht (37). Teilsequenzen von Initiator-tRNAs aus Weizenkeimen (60), aus *Streptococcus faecalis* (61), aus der Alge *Anacystis*

nidulans (62) und aus Mycoplasma mycoides (63) geben zusätzliche Informationen über Sequenzhomologien von Initiator-tRNAs. In Abb. 24 sind die Sequenzen und Teilsequenzen von bisher analysierten Initiator-tRNAs angegeben.

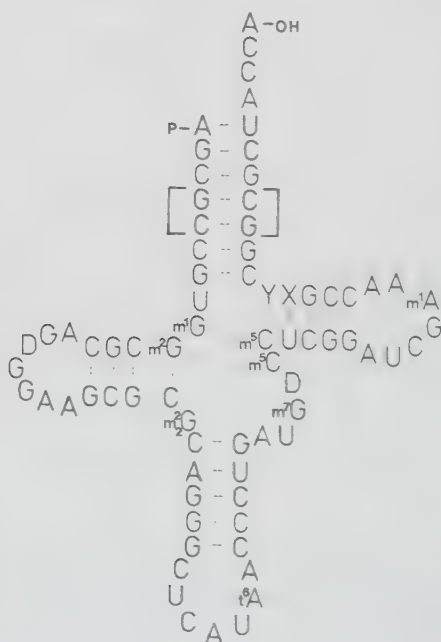
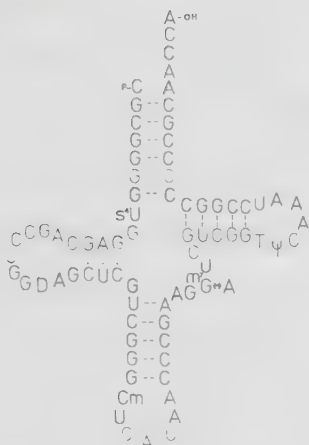
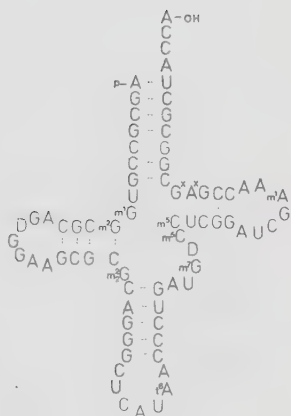


Abb. 23 : Zweidimensionale Darstellung der tRNA^{Met}_f aus Brauereihefe. Die Reihenfolge der Nucleotide in den Klammern ist noch nicht eindeutig aufgeklärt.

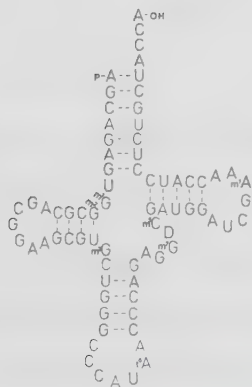
A.



B.

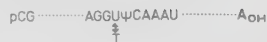


C.



D.

STREPTOCOCCUS FARCALIS



WEIZENKEIM



MYCOPLASMA



ANACYSTIS NIOULANS



Abb. 24 : Nucleotidsequenzen von Initiator-tRNAs

A. : E.coli B. : Bäckerhefe C. : Maus-Myeloma,
Rattenleber, Brustdrüse des Schafes D. : Teilsequen-
zen.

Beim Vergleich der Sequenzen der methionin-spezifischen tRNAs findet man sehr große Ähnlichkeiten zwischen allen eukaryontischen Initiator-tRNAs. Die Sequenzen der Initiator-tRNAs aus Rattenleber (37), aus der Brustdrüse des Schafes (37) und von P₃-Myeloma Zellen (36) sind identisch. Auch die Initiator-tRNAs aus Bäckerhefe (35) und Brauereihefe haben die gleiche Nucleotidsequenz. Als besonderes Merkmal findet man in eukaryontischen Initiator-tRNAs die Sequenz G-A-U-Cp an Stelle der Sequenz **G-T-ψ-Cp** in der Schleife 4 der tRNA. Die letztgenannte Sequenz kommt sowohl in Initiator-tRNAs aus Prokaryonten, als auch in allen anderen tRNAs vor (64), die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind.

Ein weiterer Unterschied zwischen Initiator-tRNAs aus Prokaryonten und Eukaryonten ist am 5'-Ende dieser tRNAs. Die erste Base der tRNA^{Met_f} aus Prokaryonten kann kein Watson-Crick Basenpaar mit der fünften Base vom 3'-Ende bilden. Möglicherweise ist diese strukturelle Besonderheit für zwei Eigenschaften der Initiator-tRNA aus E. coli ausschlaggebend.

1. Die Met-tRNA^{Met_f} aus E. coli kann nicht an den T_u-Faktor aus E. coli binden (65).
2. Die fMet-tRNA^{Met_f} aus E. coli reagiert nicht mit der Peptidyl-tRNA-Hydrolase (66).

Interessant ist, daß sich in allen bisher sequenzierten Initiator-tRNAs aus Säugetierzellen neben dem 5'-Ende des Anticodons ein Cp befindet, wogegen alle anderen bisher sequenzierten tRNAs in dieser Position ein Up haben. Ob diese Besonderheit von biologischer Bedeutung ist, ist allerdings noch nicht geklärt.

Ein Vergleich der Primärstrukturen von isoakzeptierenden tRNAs könnte zu Hinweisen führen, welche Sequenzen oder Regionen der tRNAs essentiell für die Synthetase-Erkennung sind. Dabei geht man von der Annahme aus, daß verschiedene tRNAs, die vom gleichen Enzym aminoacyliert werden, identische Regionen haben, die bei der Wechselwirkung der tRNA mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase spezifitätsbestimmend sind. Vergleicht man die zur Zeit bekannten Nucleotidsequenzen der methionin-spezifischen tRNAs, die von der Methionyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* beladen werden (64), so findet man, abgesehen vom Anticodon, nicht mehr Sequenzhomologien, als sie bei anderen tRNAs gefunden wurden. In Abb. 25 sind die identischen Regionen aller bisher sequenzierten methionin-spezifischen tRNAs aufgezeigt. Von 26 Nucleotiden, die in allen methionin-spezifischen tRNAs vorkommen, findet man 13 in allen bisher analysierten tRNAs. Diese letztgenannten Nucleotide können daher bei der Reaktion der tRNA mit der Aminoacyl-tRNA-Synthetase nicht

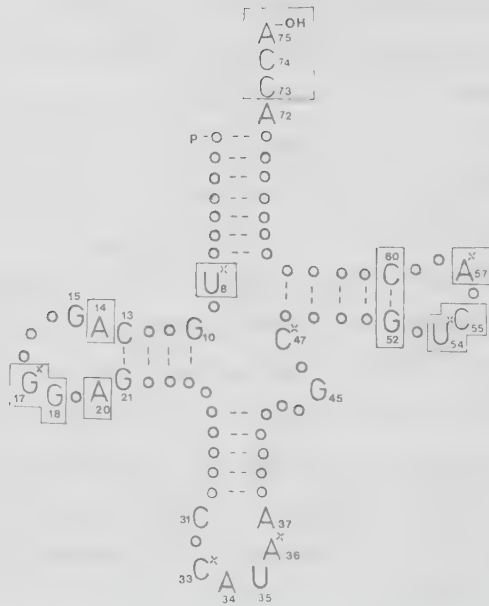


Abb. 25 : Sequenzhomologien in allen bisher sequenzier-
ten methionin-spezifischen tRNAs. Nucleotide, die nicht
in allen methionin-spezifischen tRNAs vorkommen, sind
als offene Ringe gekennzeichnet. Nucleotide, die in allen
analysierten tRNAs vorkommen, sind in Vierecke gezeich-
net. Nucleotide, die in tRNAs häufig modifiziert vor-
kommen, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

spezifitätsbestimmend sein. Die restlichen 13 Nucleotide, die in allen bisher sequenzierten methioninspezifischen tRNAs vorkommen, sind in der Sequenz der tRNA^{Met_f} zum Teil weit voneinander entfernt. Durch Faltung der Nucleotidkette könnten diese Nucleotide, ähnlich wie bei der Bildung der aktiven Zentren von manchen Enzymen, in die sterisch richtige Position gebracht werden, um so die spezifische Wechselwirkung der tRNA^{Met_f} mit der Methionyl-tRNA-Synthetase zu ermöglichen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Materialien

Unfraktionierte tRNA aus Brauereihefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. Brauereihefe (*Saccharomyces cerevisiae* Stamm C₈₃₆) war von der Firma Merck, Darmstadt. Hefe-RNA war von British Drug Houses Ltd., England. 3'- und 5'-Nucleotide waren von der Firma Sigma chem. Corp., St. Louis.

Die Ribonucleasen T₁ (EC 3.1.4.8.), T₂ (EC 3.1.4.23.) und U₂ (EC 3.1.4.-) wurden von der Firma Sankyo Co. , Japan, gekauft. Ribonuclease A aus Rinderpankreas (EC 3.1.4.22.) mit einer spezifischen Aktivität von

40 E / ml wurde von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. Die Phosphodiesterasen aus Schlangengift (EC 3.1.4.1.) und Kälbermilz (EC 3.4.1.) wie auch die Phosphomonoesterase aus E. coli (EC 3.1.3.1) stammten von der Firma Worthington Biochemical Corp., Freehold, N.J.. Das Gemisch der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (EC 6.1.1.), gereinigt durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung (45 - 67 % Sättigung), wurde von R. Hirsch und G. Kwiatkowski zur Verfügung gestellt. BD-Cellulose und DEAE-Cellulose wurden bei der Firma Serva, Entwicklungslabor Heidelberg, eingekauft. Sephadex G-25 war von der Firma Pharmacia, Uppsala. Whatman DEAE-Cellulose Papier und 3 MM Papier wurden von der Firma Hormuth-Vetter, Heidelberg, bezogen. Celluloseacetat-Elektrophoresepapier war von der Firma Satorius Membran-Filter GmbH, Göttingen, Dünnschichtplatten mit einer 0,1 mm dicken Cellulose-Schicht stammten von der Firma Merck, Darmstadt. POLYGRAM CEL 300 DEAE / HR - 2 / 15 Folien und POLYGRAM CEL 300 DEAE waren von der Firma Macherey und Nagel Co., Düren. Zur Autoradiografie wurde ein Kodak RP / S 14 XO-mat Film verwendet.

Die Reagenzien waren, wenn nicht extra erwähnt, von der Firma Merck, Darmstadt, mit dem Reinheitsgrad p.A. A T P ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$) stammte von der Firma Zellstoff,

Waldhof. Die Substanzen für die Gelelektrophorese stammten von der Firma Serva, Entwicklungslabor Heidelberg. Das CMCT-Reagenz (N-Cyclohexyl-N'-(β -(N-methyl-morpholino)-äthylcarbodiimid-p-toluolsulfonat)) und die Farbstoffe Fuchsinsäure und Xylene Cyanol waren von der Firma Fluka AG. Der Farbstoff Orange G-2 wurde von der Firma G.T. Gurr Ltd., London, gekauft. Die Farbstoffmischung bestand aus 1 % Xylene Cyanol, 2 % Orange G und 1 % Fuchsin. Das ^{32}P -markierte Phosphat und die ^{14}C -markierte Aminosäure Methionin (spez. Akt. 12,8 C / M) stammten von The Radiochemical Centre, Amersham, Omnifluor war von der New England Nuklear Corp., Boston, Massachusetts, USA. Triäthylammonium-carbonat (30 % Triäthylamin dest., 70 % Wasser) wurde durch Einleiten von CO_2 dargestellt ; der pH Wert wurde mit Triäthylamin auf pH 10 eingestellt. VARSOL war ein Produkt der Esso Petroleum Comp. Die Lösungsmittel waren von der Firma Merck, Darmstadt.

5.2. Apparative Hilfsmittel

Zur Messung der UV-Absorption wurde ein Spektralfotometer PMQ II der Firma Zeiss, Oberkochen, benutzt. Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Flüssigkeits-Scintillationszähler (Tricarb Modell 3310 oder in einem Gerät von der Firma Nuclear Chicago

Iso Cab 300) ausgeführt. Die Einrichtung für die Hochspannungs-Elektrophorese wurde von der Werkstatt des Instituts für Physiologische Chemie, München, gebaut.

5.3. Methoden zur Darstellung der tRNA_f^{Met}

5.3.1. Anzucht von Hefe und Isolierung der tRNA

Das flüssige Kulturmedium der Vorkultur bestand aus 1 % Glucose, 2 % Pepton (tryptisch verdaut), 1 % Hefeextrakt pH 5,5. Diese Vorkultur wurde 24 Stunden unter Schütteln bei 28 Grad angezogen. Von dieser Vorkultur wurden mit einer sterilen Pipette 2 ml entnommen und in 4 l sterilisiertes Kulturmedium pipetiert, das 100 mC ³²P-Phosphat und 0,4 ml Silikonentschäumer enthielt. Ein Liter Kulturmedium hatten folgende Zusammensetzung : 10 g Glukose, 2 g Zitronensäure, 2,5 g Pepton aus Fleisch (tryptisch verdaut), 13 mg Glyceromonophosphat, 10 ml Spurenelementlösung, 0,01 mg Biotin und 0,5 mg Calcium-Pantothenat. Diese Lösung wurde mit 6 N Natronlauge auf pH 5,5 eingestellt. In 100 ml Spurenlösung waren 23 g NaCl, 7,4 g KCl, 1,1 g CaCl₂, 0,1 g NaSO₄, 3 mg FeCl₃ und 5 ml 1 M MgCl₂ gelöst. Die Hauptanzucht erfolgte bei 28 Grad unter starker Belüftung. Die Hefe wurde in der spät-

logarithmischen Phase, die ungefähr nach 15 Stunden erreicht wurde, durch Zentrifugation geerntet. Zur Extraktion der tRNA wurde die Phenolmethode nach Holley et al. (47) verwendet.

5.3.2. Chromatografie von tRNA an DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose wurde nach Referenz 40 vorbehandelt, mit Puffer (0,1 M NaCl, 0,02 M Na-acetat, 0,01 M $MgCl_2$, pH 6,5) geschlämmt und in einer Säule (2 x 120 cm) mit 0,1 M NaCl in Puffer äquilibriert. Das Eluieren des aufgetragenen Materials erfolgte mit einem Stufengradienten (je 200 ml) von 0,01 bis 1,2 M NaCl in Puffer. Es wurden Fraktionen von 5 ml gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 50 ml pro Stunde.

5.3.3. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose bei pH 5,0

Die BD-Cellulose wurde vor Gebrauch nach Ref.44 vorbehandelt und in Puffer (0,45 M NaCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,05 M Na-acetat, pH 5,0) eingeschlämmt, in eine Säule (1 x 113 cm) unter 1 atü Druck eingefüllt und mit 0,45 M NaCl in Puffer äquilibriert. Die tRNA wurde mit einem linearen Gradienten (je 600 ml) von 0,45 bis 0,95 M NaCl in Puffer eluiert.

Es wurden Fraktionen von 3,8 ml gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit war 40 ml pro Stunde. Die Säule wurde mit einer peristaltischen Schlauchpumpe betrieben, die einen Druck von ca. 1,5 atü ergab.

5.3.4. Chromatografie von tRNA an BD-Cellulose bei pH 3,0 in Gegenwart von 7 M Harnstoff

BD-Cellulose wurde wie in Ref. 46 vorbehandelt, mit Puffer (7 M Harnstoff, 0,23 M NaCl, pH 3,0) geschlämmt und in einer Säule (0,6 x 47 cm) mit 0,24 M NaCl in Puffer äquilibriert. Die aufgetragene tRNA wurde in einem linearen Gradienten (je 200 ml) von 0,24 bis 0,40 M NaCl in Puffer eluiert. Pro Fraktion wurden 1 ml gesammelt. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 15 ml die Stunde. Die Säule wurde mit einer peristaltischen Schlauchpumpe bei einem Druck von 1,5 atü betrieben.

5.3.5. Gelelektrophorese der tRNA

Die Gelelektrophorese wurde in einem Plattengel-Apparat in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt (50). Das Gel hatte eine Dimension von 20 x 40 x 0,3 cm. Die Trenngellösung

bestand aus 10 % Acrylamid und 0,4 % Bismethylenacrylamid in Puffer (0,08 M TRIS-Boratpuffer pH 8,3 0,001 M EDTA und 7 M Harnstoff). Als Katalysator für die Polymerisation wurden pro 100 ml Gellösung 0,5 ml 10 %iges Ammonpersulfat und 0,05 ml TEMED conc. verwendet. Das Sammelgel bestand aus 1 Volumteil "Cyangum" (19 % Acrylamid und 1 % Bismethylenacrylamid in Wasser) 0,5 Volumteile 0,05 M TRIS-HCl pH 6,0 und 2 Volumteilen 7 M Harnstofflösung. Als Katalysator wurden für 25 ml Gellösung 0,3 ml 10 %ige Ammoniumpersulfat-Lösung und 0,03 ml TEMED conc. verwendet. Aufgetragen wurde die tRNA in 0,05 ml Farbstofflösung (60 % Sucrose, 4 M Harnstoff, 0,1 M Na-acetat pH 4,5 und 1 % Xylen-Cyanol FF). Die Elektrophorese wurde bei 4 Grad mit 10 Volt / cm (ca. 36 Stunden) durchgeführt.

5.3.6. Extraktion der tRNA^{Met_f} aus dem Gel

Zur Lokalisierung der unmarkierten RNA wurde das Gel mit Toluidinblau angefärbt (67). Die gefärbten Gelzonen wurden ausgeschnitten und zerkleinert. Die RNA wurde mit 0,2 M NaCl aus dem Gel extrahiert (68) und mit Äthanol gefällt. Die ³²P-markierte RNA wurde durch Autoradiografie lokalisiert. Die entsprechenden Gelzonen wurden ausgeschnitten und zerkleinert.

die tRNA wurde durch Elektrophorese in 0,02 M Na-acetat, 0,05 M TRIS-HCl, 0,001 M EDTA pH 8,0 aus einem Rundgel auf ein DEAE-Cellulose-Papier elektrophoretisiert.

5.4. Spaltung von tRNA^{Met_f} und Oligonucleotiden mit verschiedenen Nucleasen

5.4.1. Spaltung von tRNA^{Met_f} und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T₂

Ca. 0,5 A₂₆₀-Einheiten tRNA wurden mit 25 mE RNAase T₂ in 0,01 ml 0,05 M Na-acetat, pH 4,6 für 4 Stunden bei 37 Grad inkubiert (56). Zur Spaltung von Oligonucleotiden wurden für ca. 0,05 A₂₆₀-Einheiten der Oligonucleotide 10 mE RNAase T₂ unter identischen Spaltungsbedingungen verwendet.

5.4.2. Spaltung von tRNA^{Met_f} und Oligonucleotiden mit Ribonuclease T₁

Ca. 3×10^6 Imp / Min ³²P-markierter tRNA (ca. 1,5 A₂₆₀-Einheiten tRNA) wurden mit 0,001 mg RNAase T₁ in 0,01 ml 0,01 M TRIS-HCl, 0,001 M EDTA, pH 7,4 für 30 Min. bei 37 Grad inkubiert. Die Spaltung der Oligonucleotide wurde unter identischen Bedingungen durch-

geführt (34).

5.4.3. Spaltung von tRNA^{Met_f} und Oligonucleotiden
mit Ribonuclease A

Ca. 3×10^6 Imp / Min ³²P-markierte tRNA (ca. 1,5 A₂₆₀-Einheiten tRNA) wurden mit 0,005 mg RNAase A in 0,01 ml 0,01 M TRIS-HCl, 0,001 M EDTA, pH 7,5 für 30 Min. bei 37 Grad inkubiert. Zur Spaltung der Oligonucleotide wurden 0,001 mg RNAase A unter identischen Spaltbedingungen eingesetzt (34).

5.4.4. Spaltung von Oligonucleotiden mit RNAase U₂

Zur Spaltung von ca. 0,05 A₂₆₀-Einheiten des Oligonucleotids wurden 1 mE RNAase U₂ in 0,01 ml 0,05 M Na-acetat, 0,002 M EDTA, 0,1 mg / ml Albumin aus Rinderserum, pH 4,5 für 2 Stunden bei 37 Grad inkubiert (56).

5.4.5. Spaltung von Oligonucleotiden mit Phosphodiesterase aus Schlangengift

Zur Spaltung von Oligonucleotiden mit einem 3'-terminalen Phosphat wurden ca. 0,05 A₂₆₀-Einheiten der Oligonucleotide mit 2 mE Enzym in 0,01 ml 0,01 M TRIS-HCl, 0,01 M MgCl₂, pH 8,9 2 Stunden bei 37 Grad

inkubiert. Zur Hydrolyse von Oligonucleotiden ohne 3'-terminalen Phosphat wurde mit 1 mE Enzym unter identischen Bedingungen inkubiert (56).

5.4.6. Partieller Abbau von Oligonucleotiden mit Phosphodiesterase aus Schlangen- gift

Nach Abspaltung des 3'-terminalen Phosphats des Oligonucleotids mit PME aus *E. coli* wurden die Reaktionsprodukte durch kurze Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier bei pH 1,9 getrennt. Das dephosphorylierte Oligonucleotid wurde nach Zugabe von 0,02 mg Hefe-RNA mit 2 mE Enzymlösung (s. 4.5.) bei Raumtemperatur inkubiert. Zu bestimmten Zeiten der Inkubation (0, 10, 20 Minuten) wurden aliquote Teile entnommen und die Reaktion durch Auftragen auf DEAE-Cellulose-Papier beendet.

5.4.7. Spaltung von Oligonucleotiden mit alkalischer Phosphatase aus *E. coli*

Die Spaltung wurde wie in Ref. 56 angegeben, ausgeführt. Zur Hydrolyse von 2'-3' cyclischen Phosphaten wurde das Oligonucleotid mit 0,01 ml 0,1 N HCl bei 37 Grad für 60 Minuten inkubiert. Die Säure wurde

durch Gefriertrocknung entfernt. Das Oligonucleotid wurde mit 0,001 mg Enzym in 0,01 ml 0,05 M TRIS-HCl, 0,01 M $MgCl_2$, pH 8,0 für 60 Minuten bei 37 Grad inkubiert.

5.4.8. Partieller Abbau von Oligonucleotiden mit Phosphodiesterase aus Kälbermilz

Ca. $1,2 \times 10^4$ Imp / Min des Oligonucleotids wurden mit 0,004 mg PDE aus Kälbermilz in 0,02 ml 0,1 M Ammoniumacetat, 0,002 M EDTA, 0,05 % TWEEN 60, pH 5,7 aufgenommen und bei Raumtemperatur inkubiert. Zu bestimmten Zeiten (0, 20, 40 Minuten) wurden aliquote Teile dem Reaktionsgemisch entnommen und durch die Reaktion durch Bindung der Spaltprodukte an DEAE-Cellulose-Papier beendet.

5.4.9. Modifizierung von Oligonucleotiden mit CMCT und Spaltung mit Ribonuclease A

Zur Modifizierung mit CMCT (N-Cyclohexyl-N'-β-(N-methyl-morpholino)-äthylcarbodiimid-p-toluosulfonat)) wurde das Oligonucleotid mit 1 mg CMCT in 0,01 ml 0,01 M TRIS-HCl, 0,001 M EDTA, pH 8,2 ca. 12 Stunden bei 37 Grad inkubiert. Anschließend wurden die modifizierten Oligonucleotide mit 0,001 mg RNAase A in

0,02 ml Enzympuffer (vgl. 4.3.) aufgenommen und für eine Stunde bei 37 Grad inkubiert. Zur Abspaltung des CMCT-Restes von den modifizierten Nucleotiden wurde mit 0,02 ml 0,2 N Ammoniumhydroxyd ca. 12 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert (56).

5.4.10. Spaltung der tRNA^{Met_f} mit RNAase T₁ unter limitierenden Bedingungen

Die tRNA^{Met_f} wurde wie in Ref. 56 beschrieben gespalten; ca. 5×10^6 Imp / Min ³²P-markierte tRNA^{Met_f} wurden mit 0,1 mg Hefe-RNA eingetrocknet. Die Substanz wurde mit 0,25 mE RNAase T₁ in 0,01 ml 0,024 M MgCl₂, 0,01 M TRIS-HCl, pH 7,5 aufgenommen und für 10 Min bei 4 Grad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Auftragen auf Celluloseacetat-Papier gestoppt. Das Enzym-Substratverhältnis bei dieser Reaktion war 1 : 400.

5.5. Trennung von Oligonucleotiden und Mononucleotiden

5.5.1. Elektrophorese von Oligonucleotiden auf Celluloseacetat-Papier

Ein Celluloseacetat-Streifen wurde wie in Ref. 34

beschrieben mit Pufferlösung angefeuchtet und die Probe aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 90 Minuten bei 100 Volt pro cm in einem VARSOL-Bad ausgeführt. Anschließend wurden die Oligonucleotide auf DEAE-Cellulose-Papier übertragen (34) und die Auftragsstelle dreimal mit Äthanol gewaschen.

5.5.2. Elektrophorese von Oligonucleotiden auf DEAE-Cellulose-Papier

Die Trennung von Oligonucleotiden durch Elektrophorese auf DEAE-Cellulose-Papier erfolgte in 7 % Ameisensäure, in Puffer pH 3,5 oder in Puffer pH 1,9 (vgl. Ref.34) bei 10 Volt pro cm in einem gekühlten VARSOL-Bad. Die Laufzeit betrug 14 Stunden.

5.5.3. Dünnschicht-Chromatografie von Mononucleotiden und Dinucleotiden auf Cellulose Platten

Die Identifizierung der Mononucleotide erfolgte durch ihr chromatografisches Verhalten auf Cellulose-Platten (20 x 20 cm) in zwei Systemen :

System A : 17,6 ml conc. HCl, 68 ml Isopropanol,
14,4 ml Wasser (69).

System B : 50 ml Isobuttersäure, 30 ml 0,5 N Ammoniumhydroxid (70).

5.5.4. Elektrophorese von Mononucleotiden auf Whatman 3 MM-Papier

Zur weiteren Identifizierung der Mononucleotide wurden diese nach Ref. 34 elektrophoretisch auf Whatman 3 MM-Papier bei pH 3,5 (5 % Essigsäure, 0,5 % Pyridin) aufgetrennt (System C).

5.5.5. Homochromatografie von tRNA-Fragmenten

Nach der Elektrophorese der Fragmente auf Celluloseacetat-Papier (vgl. 5.1.) wurden die Fragmente auf DEAE-Cellulose-Folie oder auf eine Mischfolie aus DEAE-Cellulose und Cellulose übertragen (59). Die Chromatografie der Fragmente in der zweiten Richtung erfolgte dann mit Homomix b (56) bei 60 Grad (ca. 8 Stunden).

5.5.6. Radioaktivitätsmessungen

Die Radioaktivität von RNA-Lösungen in einem Bray-Scintillator-Gemisch (71) gemessen. Die radioaktivität von RNA auf Filterpapier wurde in einem Toluol-scintillator (4 g OMNIFLUOR pro 1 l dest. Toluol) gemessen.

5.5.7. Elution von tRNA und Oligonucleotiden von
DEAE-Cellulose-Papier

Die tRNA und die Oligonucleotide wurden nach der Methode von Edström (72) mit 30 % Triäthyl-ammoniumcarbonat vom DEAE-Cellulose-Papier eluiert. Die Lösung wurde in einem Exsikkator über P_2O_5 eingetrocknet. Die Substanz wurde zwischendurch mit 0,01 ml Wasser aufgenommen und die Lösung eingetrocknet. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.

5.5.8. Bestimmung der Akzeptoraktivität der tRNA^{Met}

Die Akzeptoraktivität wurde wie in Ref. 73 bestimmt. Die spezifische Aktivität von Methionin war 12,8 C/M.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im ersten Teil der Arbeit werden Methoden für die Isolierung der tRNA^{Met_f} aus dem Brauereihefe-Stamm C₈₃₆ beschrieben. Durch Kombination verschiedener Trennmethoden an DEAE-Cellulose und BD-Cellulose und weiterer Anreicherung der tRNA^{Met_f} durch Gelelektrophorese in einem 10 % Polyacrylamid-Gel (pH 8,3) konnte sequenzeinheitliche tRNA^{Met_f} erhalten werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Bestimmung der Primärstruktur der tRNA^{Met_f} aus Brauereihefe nach der Methode von Sanger et al. (34) beschrieben. Diese Methode erforderte eine ³²P-markierte tRNA mit einer spezifischen Aktivität von 1×10^6 Imp / Min / A₂₆₀-Einheit tRNA als Ausgangsmaterial. Die Nucleotidanalyse der tRNA^{Met_f} mit RNAase T₂ zeigte, daß diese tRNA aus 75 Nucleotiden zusammengesetzt ist, von denen 12 modifiziert sind (2 Mol m⁵Cp, 2 Mol Dp, je 1 Mol m¹Gp, m²Gp, m²Gp, m⁷Gp, m¹Ap, t⁶Ap und 1 Mol eines unbekannten Dinucleotids, das in dieser Arbeit X-Yp benannt wurde. Dieses Dinucleotid konnte weder mit RNAasen noch mit 10 % Piperidin oder 0,2 N KOH unter den üblichen Bedingungen der Totalspaltung (56) hydrolysiert werden. Zur Sequenzanalyse wurde die

tRNA^{Met}_f mit den RNAasen T₁ und A gespalten und die Spaltprodukte wurden durch zweidimensionale Elektrophorese getrennt. Bei der Spaltung der tRNA^{Met}_f mit RNAase T₁ entstanden 15 Oligonucleotide, während nach Spaltung der tRNA^{Met}_f mit RNAase A 20 Oligonucleotide aufgefunden wurden. Zur Bestimmung der Reihenfolge der Nucleotide wurden die Oligonucleotide mit spezifischen Nucleasen (RNAase T₁, RNAase A, RNAase U₂, Phosphodiesterase aus Schlangengift und Phosphodiesterase aus Kälbermilz) gespalten und die Spaltprodukte mit Hilfe von RNAase T₂ analysiert.

Zur Ableitung der vollständigen Primärstruktur der tRNA^{Met}_f war es ausserdem notwendig, eine Anzahl größerer Fragmente darzustellen. Solche Fragmente wurden durch Spaltung der tRNA^{Met}_f mit RNAase T₁ unter limitierenden Bedingungen erhalten. Diese Fragmente wurden mit RNAase T₁ gespalten und die Spaltprodukte wurden durch Nucleotidanalyse mit RNAase T₂ oder aufgrund ihrer Position auf dem " Fingerprint " identifiziert. Mit Hilfe der Information von 14 Fragmenten und den Oligonucleotiden, die durch Spaltung der tRNA^{Met}_f mit den RNAasen T₁ und A entstanden waren, wurde die Primärstruktur der tRNA^{Met}_f mit Ausnahme der Reihenfolge der Nucleotide 4-5 und 67-68 aufgeklärt.

7. Literaturverzeichnis

1. Zachau, H.G. (1969) Angew. Chem. 81, 646-662
2. Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C. und Stephenson, M.L.
(1957) J. Biol. Chem. 231, 241-251
3. Ogata, K. und Nohara, H. (1957) Biochem. Biophys.
Acta 25, 659-660
4. Zachau, H.G., Acs, G. und Lipmann, F. (1958)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 44, 885-889
5. Nirenberg, M., Caskey, T., Marshall, R., Briacombe,
R., Kellog, D., Doctor, B., Hatfield, D., Levin, J.,
Rottman, F., Peska, S., Wilcox, M. und Anderson, F.
(1966) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31,
11-24
6. Crick, F. H. C. (1966) J. Mol. Biol. 19, 584-566
7. Ohashi, Z., Saneyoshi, M., Harada, F., Hara, H.
und Nishimura, S. (1970) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 40, 866-872

8. Barnett, W.E. und Brown, D.H. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 452-458
9. Smith, A.E. und Marcker, K.A. (1968) J. Mol. Biol. 38, 241-243
10. Daniel, V., Sarid, S. und Littauer, U.Z. (1970) Science 167, 1682-1688
11. Carnegie, J.W., Deeney, A.O., Olson, O.C. und Beaudreau, G.S. (1969) Biochem. Biophys. Acta 190, 274-284
12. Mushinski, J.F. und Potter, M. (1969) Biochemistry 8, 1684-1692
13. Yang, W.R. und Novelli, G.D. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 534-539
14. Bick, M.D., Liebke, H., Cherry, H.J. und Strehler, B. (1970) Biochem. Biophys. Acta 204, 175-182
15. Goodman, H.M., Abelson, J., Landy, A., Brenner, S. und Smith, J.D. (1968) Nature 217, 1019-1024

16. Littauer, U.Z. und Inouye, H. (1973)
Ann. Rev. Biochem. 42, 439-470
17. Clark, B.F.C. und Marcker, K.A. (1966)
J. Mol. Biol. 17, 394-406
18. Dickerman, H.W., Steers, E., Redfield, B.G.
und Weissbach, H. (1967)
J. Biol. Chem. 142, 1522-1525
19. Caskey, C.T., Redfield, B. und Weissbach, H.
(1967) Arch. Biochem. Biophys. 120, 119-123
20. Feldmann, H., Harring, H. und Gruhl, H. (1971)
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 352, 1231-1247
21. RajBhandary, U.L. und Ghosh, H.P. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 1104-1113
22. Burkard, G., Eclancher, B. und Weil, J.H. (1969)
FEBS Lett. 4, 285-287
23. Smith, A.E. und Marcker, K.A. (1970)
Nature 226, 607-610

24. Gruhl, H. und Feldmann, H. (1975)
FEBS Lett. 57, 145-148

25. Leis, J.P. und Keller, E.B. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 416-421

26. Kurland, C.G. (1970)
Science 169, 1171-1177

27. Haselkorn, R. und Rothman-Denes, L.B. (1973)
Ann. Rev. Biochem. 42, 397-438

28. Revel, M., Herzberg, M. und Greenshpan, H. (1969)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 261-275

29. Salas, M., Miller, M.J., Albert, J., Whaba, A.J.
und Ochoa, S. (1967)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57, 1865-1869

30. Lucas-Lenard, J. und Lipmann, F. (1971)
Ann. Rev. Biochem. 40, 409-448

31. Nirenberg, M. und Leder, P. (1964)
Science 145, 1199-1407

32. Ghosh, H.P., Söll, D. und Khorana, H.G. (1967)
J. Mol. Biol. 25, 275-298
33. Brown, J.C. und Smith, A.E. (1970)
Nature 226, 610-612
34. Sanger, F., Brownlee, G.G. und Barrell, B.G. (1965)
J. Mol. Biol. 13, 373-398
35. Simsek, M. und RajBhandary, U.L. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 508-515
36. Piper, P.W. und Clark, B.F.C. (1974)
Nature 247, 516-518
37. Simsek, M., RajBhandary, U.L., Boissard, M. und
Petrissant, G. (1974)
Nature 274, 518-520
38. Holley, R.W. und Merrill, S.H. (1959)
J. Amer. Chem. Soc. 81, 753
39. Zachau, H.G., Tada, M., Lawson, W.B. und
Schweiger, M. (1961)
Biochim. Biophys. Acta 53, 221-223

40. Cherayil, J.D. und Bock, R.M. (1965)
Biochemistry 4, 1174-1183
41. Takeishi, K., Ukita, T. und Nishimura, S. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 5761-5769
42. Gauss, D.H., von der Haar, F., Maelicke, A. und
Cramer, F. (1971)
Ann. Rev. Biochem. 40, 1045-1078
43. Weiss, J.F., Pearson, R.L. und Kelmers, A.D.
(1968) Biochemistry 7, 3479-3487
44. Gillam, I., Milward, S., Blew, D., v. Tigerstrom,
M., Wimmer, E. und Tener, G.M. (1967)
Biochemistry 6, 3043-3056
45. Maxwell, I.H., Wimmer, E. und Tener, G.M. (1968)
Biochemistry 7, 2629-2634
46. Fittler, F., Kruppa, J. und Zachau, H.G. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 277, 513-521
47. Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T.,
Merrill, S.H. und Zamir, A. (1963)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 117-121

48. Maurer, H.R. (1971). Disc Electrophoresis
(Berlin-New York: Walter de Gryter Verlag)

49. Varricchio, F. und Seno, T. (1973)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 522-528

50. Blatt, B. und Feldmann, H. (1973)
FEBS Lett. 37, 129-133

51. Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison,
J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.T.
und Zamir, A. (1965)
Science 147, 1462-1464

52. Székely, M. und Sanger, F. (1969)
J. Mol. Biol. 43, 607-617

53. Uchida, T. und Egami, F. (1967)
J. Biochem. (Tokyo) 61, 44-53

54. Nishimura, S., Harada, F., Narushima, U. und
Seno, T. (1967)
Biochim. Biophys. Acta 142, 133-148

55. Egami, F. und Nakamura, R. (1969)
Microbial Ribonucleases (New York: Springer Verlag)

56. Brownlee, G.G. (1972)
Determination of Sequences in RNA
(Amsterdam: North-Holland Publishing Company)
57. Barnard, E.A. (1969)
Ann. Rev. Biochem. 38, 677-732
58. Cory, S. und Marcker, K.A. (1970)
Eur. J. Biochem. 12, 177-194
59. Brownlee, G.G. und Sanger, F. (1969)
Eur. J. Biochem. 11, 395-399
60. Ghosh, K., Ghosh, H.P., Simsek, M. und RajBhandary, U.L. (1974)
J. Biol. Chem. 249, 4720-4729
61. Delk, A.S. und Rabinowitz, J.C. (1974)
Nature 252, 106-109
62. Ecarot, B. und Cedergren, R.J. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 400-405
63. Walker, R.T. und RajBhandary, U.L. (1975)
Nucleic Acids Res. 2, 61-78

64. Barrell, B.G. und Clark, B.F.C. (1974)
Handbook of Nucl. Acid Sequences
(Oxford: Johnson- Bruivers Ltd.)
65. Ono, Y., Skoultchi, A., Klein, A. und Lengyel, P.
(1968) Nature 220, 1304-1307
66. Kössel, H. und RajBhandary, U.L. (1968)
J. Mol. Biol. 35, 539-560
67. Peacock, A.C. und Dingman, C.W. (1967)
Biochemistry 6, 1818-1827
68. Hindley, J. (1967)
J. Mol. Biol. 30, 125-136
69. Wyatt, G.R. (1951)
Biochem. J. 48, 584-590
70. Nishimura, S. (1972)
Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 12, 50-85
71. Bray, C.A. (1960)
Anal. Biochem. 1, 279-285

72. Edström, R.D. (1968)
Anal. Biochem. 26, 204-205
73. Zachau, H.G. (1974)
in Bergmeyer, H.U., Methoden der Enzymatischen
Analyse, (Weinheim: Verlag Chemie) 1828-1834
74. (1970) Eur. J. Biochem. 15, 203-208

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A ₂₆₀ -Einheit	Die Substanzmenge, die in 1 ml Lösung bei 1 cm Schichtdicke die Extinktion 1 (260 nm) besitzt.
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B	blauer Farbstoff (Xylene Cyanol)
BB	Bromphenolblau
BD-Cellulose	benzoylierte DEAE-Cellulose
C	Cytidin
CMCT	N-Cyclohexyl-N'-(2-(4-morpholinyl)-aethyl)-carbodiimid-methyl-p-toluol-sulfonat
D	Dihydrouridin
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
FMet	N-Formyl-methionin
G	Guanosin
Met-tRNA	Methionyl-tRNA
m ¹ A	1-Methyladenosin
m ⁵ C	5-Methylcytidin
m ¹ G	1-Methylguanosin
m ² G	2-Methylguanosin

m_2^2g	2-Dimethylguanosin
m_2^7g	7-Methylguanosin
PDE	Phosphodiesterase
PME	Phosphomonoesterase
$R_B, R_{Up},$ R_{Gp}, R_{BB}	Wanderungsstrecke einer Substanz relativ zur Wanderungsstrecke von Xylene Cyanol, Uridinphosphat, Guanosinphosphat, Bromphenolblau
RNAase	Ribonuclease
RPC	Reversed Phase Chromatografie (Chromatografie mit " umgekehrter Phase ")
T	Ribothymin
t_6^A	N^6 -(N-Threonylcarbonyl)-Adenosin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoäthan
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
tRNA $\begin{smallmatrix} Met \\ f \end{smallmatrix}$	Formylierbare methionin-spezifische tRNA
tRNA $\begin{smallmatrix} Met \\ m \end{smallmatrix}$	Nicht formylierbare methionin-spezifische tRNA
U	Uridin
ψ	Pseudouridin
Xp, Yp	Symbole für unbekannte Nucleotide (nicht identisch mit z.Z. bekannten Nucleotiden)

Die Abkürzungen für Nucleotide und Nucleinsäuren folgen den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission (74).

Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmanns Eugen Meixner und seiner Ehefrau Amalia wurde ich am 28. 4. 1942 in Graz, Österreich, geboren. Von 1948 bis 1952 besuchte ich in meiner Heimatstadt Graz die Volksschule und anschließend das 5. Bundesrealgymnasium. Nach dem Abitur begann ich 1961 das Chemiestudium an der Universität Graz, welches mit der Disser-tationsreifeprüfung abgeschlossen wurde. Im Juni 1970 begann ich unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Feldmann am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Bio-chemie und Zellbiologie der Universität München mit meiner Doktorarbeit.

